

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ УКРАИНЫ
ХАРЬКОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени В. Н. КАРАЗИНА

**ОБЩАЯ И
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ
АЛЬГОЛОГИЯ**

Харьков – 2013

УДК 582.26/27 (075.8)
ББК 28.591я73
О-28

Рецензенты:

Ю. Е. Колупаев – д-р биол. наук, профессор, Харьковский национальный аграрный университет им. В. В. Докучаева
В. Н. Сухов – канд. физ.-мат. наук, доцент, Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина

*Утверждено к печати решением Ученого совета
Харьковского национального университета имени В. Н. Каразина
(протокол № 5 от 26 апреля 2013 г.)*

О-28

Общая и экспериментальная альгология / Догадина Т. В., Комаристая В. П., Горбулин О. С., Рудась А. Н. – Х. : ХНУ имени В. Н. Каразина, 2013. – 148 с.

ISBN 978-966-623-978-8

Издание включает общие сведения о строении, размножении, экологии водорослей; показан весь спектр признаков, известных и описанных из естественных популяций с дополнением данных по ультраструктуре; описана методика сбора и изучения природного материала; методы выделения водорослей в культуру, ведения культур водорослей в лаборатории, а также основы промышленного культивирования водорослей.

Книга адресована, в первую очередь, специалистам в области естественных и технических наук, избравших водоросли в качестве объекта, но не знакомых с существующим в природе разнообразием этих организмов, спецификой их питания, размножения, биохимии, физиологии, экологии и распространения.

Может быть использована как учебное пособие студентами и преподавателями высшей школы.

ISBN 978-966-623-978-8

©Харьковский национальный университет
имени В. Н. Каразина, 2013

© Догадина Т.В., Комаристая В.П.,
Горбулин О.С., Рудась А.Н., 2013

© Литвинова О. А., макет обложки, 2013

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|---|------------|
| ВВЕДЕНИЕ..... | 4 |
| 1. ОБЩАЯ АЛЬГОЛОГИЯ..... | 10 |
| 1.1. Клетка..... | 10 |
| 1.2. Морфология..... | 41 |
| 1.3. Размножение..... | 46 |
| 1.4. Экология и распространение..... | 56 |
| 1.5. Методика изучения водорослей..... | 62 |
| 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ АЛЬГОЛОГИЯ..... | 74 |
| 2.1. Методы лабораторного культивирования..... | 77 |
| 2.1.1. Лабораторная посуда для выращивания водорослей..... | 78 |
| 2.1.2. Питательные среды..... | 78 |
| 2.1.3. Культуральный материал..... | 85 |
| 2.1.4. Методы посева и условия культивирования..... | 102 |
| 2.1.5. Ведение стерильной культуры водорослей..... | 104 |
| 2.1.6. Контроль динамики роста культур..... | 107 |
| 2.1.7. Типичные кривые динамики роста культур..... | 113 |
| 2.1.8. Контроль физиологического состояния клеток в культуре..... | 115 |
| 2.1.9. Стандартизация культур водорослей и организация экспериментальной работы с культурами в лаборатории..... | 117 |
| 2.2. Промышленная культура..... | 119 |
| 2.2.1. Цели и задачи промышленного использования водорослей..... | 119 |
| 2.2.2. Основные требования к культиваторам для промышленного выращивания водорослей..... | 128 |
| 2.2.3. Современные методы переработки биомассы..... | 135 |
| 2.2.4. Способы повышения продуктивности культур.... | 137 |
| 2.2.5. Проблемы и перспективы экспериментальной альгологии..... | 139 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ..... | 144 |
| ЛИТЕРАТУРА..... | 146 |

ВВЕДЕНИЕ

Водоросли (лат. *Algae*, греч. *Phykos* – морская трава) – чрезвычайно интересная, разнообразная во всех отношениях группа низших растений. Термин «водоросли» имеет исключительно эколого-биологический смысл и объединяет *низшие фотосинтезирующие организмы, обитающие преимущественно в воде*. Иными словами, водоросли – это первичные фотосинтетичеки нашей планеты, сохранившие примитивные черты организации и водную среду обитания. Поэтому с исторической точки зрения вполне правомерно понимание мира водорослей как единого и неделимого мира «живых ископаемых», сохранивших до наших дней все «пробы» и все «варианты» морфологической, биохимической, физиологической эволюции растительной формы жизни в воде.

Вода, как среда обитания (по сравнению с суховоздушной средой), обладает высокой степенью консерватизма, что обусловлено ее физико-химическими свойствами. Обладая плотностью, вода создает опору для гидробионтов, что ограничивает у водных фотосинтетиков развитие и совершенствование механических структур, необходимых для поддержания тела в вертикальном положении. Вода – это универсальный растворитель, в *природной* воде в доступной для водорослей (осмотрфов) форме присутствуют все элементы питания и, таким образом, нет условий для формирования соответствующих высокоспециализированных структур. Вода обладает текучестью и обеспечивает перенос продуктов жизнедеятельности (экзометаболитов), элементов размножения и распространения, что, с одной стороны, определило сохранение форм и стадий, оптимально соответствующих водной среде, с другой – ограничи-

вало появление более совершенных, узкоспециализированных структур.

Таким образом, «комфортные» условия существования в водной среде в определенной степени ограничивали эволюцию первичноводных форм, способствовали «консервации» практически всех возникающих признаков во всех вариантах, вне зависимости от их эволюционной значимости. А конвергентная эволюция в консервативной водной среде обусловила многообразие и мозаичность сочетаний признаков, их полное или частичное совпадение у представителей разных филогенетических линий развития водорослей.

Со второй половины XX ст. водоросли привлекают все большее внимание специалистов как удобные модельные объекты фундаментальной и прикладной науки. Использование широкого арсенала современных методов в изучении водорослей привело к информационному «цунами» – огромная масса фактов, часто противоречивых и трудно сопоставимых, полученных разными методами и на разных объектах, подрывает устоявшиеся традиционные взгляды и постулаты теоретической биологии. Значительно возрос интерес к вопросам эволюции и филогении; появилось большое число работ по цитологии, физиологии и биохимии водорослей. Предлагаются все новые и новые системы, авторы которых по-разному решают вопросы выделения или объединения видов в надвидовые таксоны всех рангов. При этом сложность филогенетических отношений между разными группами организмов не всегда находит свое отражение в предлагаемых системах, что зависит от:

- *критериев*, принимаемых разными авторами при составлении системы;
- *целей*, которые ставят перед собой авторы систем.

Вместе с тем, интерпретация, анализ и обобщение информации, уже имеющейся и вновь поступающей, весьма затруднены вследствие ряда причин:

- основной массив данных по ультраструктурному и химическому составу получен на культуральном материале и в большинстве случаев не подтвержден репрезентативным объемом исследований природных популяций;

– общеизвестно, что в условиях культуры для водорослей характерна высокая модификационная изменчивость, что ставит под сомнение эволюционную значимость признаков, выявляемых только на культуральном материале, как ненаследственных изменений (морфозов и фенкопий);

– также известно, что при культивировании водорослей довольно быстро происходит отбор форм, приспособленных к условиям культивирования, зачастую значительно отличающимся от условий естественных местообитаний, поэтому даже для признаков, наследование которых в культуре можно считать доказанным, их эволюционное значение остается под сомнением;

- в пределах таксонов высоких рангов (семейство, порядок, класс, отдел) часто детально изучено ограниченное число видов (1–2), что придает статусу выделяемых таксонов исключительно умозрительный характер и приводит к составлению искусственных систем.

Необходимо учитывать также, что отсутствует реальная возможность точного ответа на вопросы: какие признаки в пределах выделяемой группы являются более архаичными? Какие именно признаки сохранили архаичность, а какие признаки эволюционировали (или деградировали?) и как именно – сходными или различными путями в разных группах организмов? Какие именно признаки являются результатом конвергентной эволюции в неродственных группах первичноводных организмов и определялись средой обитания и выполняемой функцией, а какие – унаследованы от общих предков и действительно свидетельствуют об общности происхождения и наличии родственных связей? И, наконец, не являются ли выявляемые признаки всего лишь адаптивными модификациями, сформировавшимися в ответ на условия культивирования?

Выделение таксонов высоких рангов на основании 1–2 ультраструктурных признаков, не имеющих диагностического веса, объединение по этим признакам организмов, весьма существенно отличающихся по общему морфо-физиологическому статусу, размывает границы систематических групп и обесценивает их ранг, делает весьма проблематичным составление ключей и диагнозов без многочисленных исключений и

оговорок и, в конечном итоге, затрудняет, а в некоторых случаях практически исключает работу с естественными популяциями. Таким образом, сложившаяся сейчас ситуация в систематике вследствие спекулятивности и таксономической инфляции весьма напоминает ее долиннеевское состояние.

Авторы не поддерживают мнение о безусловной и окончательной доказанности эндосимбиотического происхождения эукариотической клетки и являются сторонниками аутогенной гипотезы. Предположения о возникновении всех органелл клетки, включая ядро, в результате процесса инвагинаций внешней мембраны малоспециализированного прокариотического предка, последующей отшнуровки замкнутых участков мембраны (компарментов) с дальнейшей их функциональной специализацией и сопутствующей морфологической дифференциацией, ничуть не более спекулятивны, чем предположения о множественных актах симбиоза, складывающих эукариотическую клетку как своеобразную «матрешку».

В любом случае, более вероятным представляется, что длительный процесс становления эукариотической клетки проходил многовариантно. При этом, уже выявленный к настоящему моменту разброс признаков свидетельствует, скорее, о случайном характере одиночных актов симбиоза, чем об эндосимбиогенезе как основном, магистральном пути возникновения и совершенствования всех клеточных органелл эукариот.

Учитывая вышесказанное, при изложении фактического материала авторы оставляют вне поля зрения, обсуждения и дискуссии многочисленные домены, империи, царства, отделы и т. п., предлагаемые в системах, при построении которых приоритет отдается биохимическим, молекулярно-генетическим, ультраструктурным признакам. Тем более, что при составлении общих характеристик групп разными авторами в качестве диагностических используются признаки и вегетативных клеток и генеративных стадий без уточнений, конкретных указаний и соблюдения корректного сравнения признака с признаком, стадии со стадией и т. д. Хотя молекулярные и ультраструктурные исследования и проявляют возможные родственные связи между таксонами, но при этом охватывают лишь незначительную часть видового раз-

нообразия, реально существующего в природе. И таким образом, выявленные признаки могут только фиксироваться, но не использоваться для широких эволюционных обобщений и построения «филогенетических» систем с выделением новых таксонов высокого ранга.

Придерживаясь традиционных взглядов на вероятный путь эволюции водорослей от первичных, малодифференцированных прокариот, содержащих хлорофилл *a* и способных к оксигенному фотосинтезу, авторы рассматривают водоросли как группу отделов, объединяемых в 4 филы в соответствии с комбинациями форм хлорофилла (табл. 1).

Таблица 1

| Филы | | Отделы |
|---------------------|---|--|
| Cyanophyta (a)+(d?) | = | Cyanophyta |
| Rhodophyta (a)+(d?) | = | Rhodophyta |
| Chromophyta (a+c) | = | Dinophyta Cryptophyta Chrysophyta (incl. Haptophyta, Prymnesiophyta) Xanthophyta incl. Eustigmatophyta (=Tribophyta) Bacillariophyta Phaeophyta |
| Chlorophyta (a+b) | = | Euglenophyta Chlorophyta (incl. Prochlorophyta, incl. Streptophyta p.p.) |

Во всех примерах, при указании систематических групп, сохраняется именно такая трактовка деления водорослей как низших первичноводных фотосинтетиков на отделы. При характеристике признаков авторы старались в большинстве случаев давать ссылки на роды, т. к. таксоны этого ранга в меньшей степени подвергаются ревизии и пересмотру и, в случае необходимости более полной информации, конкретный род всегда легче найти в соответствующих определителях. В тех случаях, когда в специальной научной литературе используются разные термины для обозначения одного и того же процесса или явления, все они указываются в скобках после наиболее употребительного (или наиболее корректного или приоритетного) термина.

Книга состоит из двух разделов. В первой части излагаются общие сведения о строении, размножении, экологии и распространении водорослей; показан весь спектр признаков, известных и описанных из естественных популяций с дополнением данных по ультраструктуре. Во второй части рассматриваются вопросы культивирования водорослей как объектов биотехнологии; излагаются основные методические приемы введения водорослей в культуру и поддержания культур, общие принципы и перспективы использования культур водорослей в различных областях деятельности человека, включая промышленное производство.

Помимо обобщения и анализа литературных данных, при написании книги авторы использовали свой многолетний (с 1964 года) опыт изучения природных популяций водорослей в ходе альгофлористических работ на разнотипных водоемах (*эфемерные, стоячие, замедленного и быстрого стока*) всех природных зон (*тундра, лесотундра, лесная и лесостепная, степи и полупустыни, горные районы*) с разной степенью антропогенной нагрузки (*от небольших горных водоемов у края тающих ледников и снежников до сточных вод различного состава и генезиса*). Использованы также результаты собственных работ с лабораторными и массовыми культурами, проводимые авторами в разные годы с разными видами водорослей и с разными целевыми установками.

Книга адресована, в первую очередь, специалистам естественных и технических наук, избравших водоросли в качестве объекта, но не знакомых с существующим в природе разнообразием этих организмов, спецификой их питания, размножения, биохимии, физиологии, экологии и распространения. Будет полезна также студентам, аспирантам, преподавателям высшей школы и научным сотрудникам в области ботаники, микробиологии, гидробиологии, экологии, биотехнологии.

ОБЩАЯ АЛЬГОЛОГИЯ

1.1. Клетка

Клетка водорослей в общебиологическом смысле имеет все составляющие живой клетки и включает протопласт с органеллами и клеточные покровы. Отличительной особенностью водорослевых клеток является разнообразие *всех* структур. При сравнении представителей из разных систематических групп по любому признаку, по любой клеточной структуре можно выстроить эволюционный ряд. При этом на примере водорослей можно не только проследить усложнение и совершенствование каждой клеточной органеллы в прогрессивной линии, связь специализации с выполняемой функцией. Выявляются также высокоспециализированные структуры, являющиеся тупиковыми и представленные в небольших группах с ограниченным числом видов.

Клеточные покровы водорослей характеризуются большим разнообразием, при этом в основе всех пограничных структур лежит плазмалемма – наружная цитоплазматическая мембрана. В голых клетках плазмалемма образует барьер между протопластом и внешней средой. В клетках, имеющих дополнительные покровы, плазмалемма осуществляет связь между протопластом и покровной структурой.

В пределах разных систематических групп (*Dinophyta*, *Chrysophyta*, *Xanthophyta*, *Chlorophyta*) известны предста-

вители, клетки которых в качестве клеточного покрова имеют только *плазмалемму*. Такие клетки называют голыми, и встречаются они как в вегетативном (*Chrysamoeba*, *Chrysarachnion*, *Dinamoebidium*, *Rhizochloris*, *Dunaliella*), так и в репродуктивном состоянии (зооспоры, гаметы). Поскольку плазмалемма не способна фиксировать форму, голые клетки постоянно находятся в метаболизирующем состоянии, формируя небольшие углубления, складки и выпячивания, иногда напоминающие гликокаликс животных клеток (*Dunaliella*), а также более крупные цитоплазматические выросты различной формы и размеров:

- нитевидные, длинные, тонкие, простые или разветвленные, иногда анастомозирующие *ризоподии* (*Chrysamoeba*, *Rhizochloris*, *Chrysarachnion*);

- выпячивания с округлыми концами – тупые короткие широкоокруглые *псевдоподии* (*Ochromonas*, *Myxochloris*) или более длинные и узкие *лобоподии* (*Brehmiella*);

- щупальцевидные *аксоподии*, число, размеры и местоположение которых видоспецифичны (*Cyrtophora*, *Palatinella*).

Для достаточно большого числа голых форм известны домики (*Chrysophyta*, *Xanthophyta*, *Euglenophyta*), имеющие разную химическую природу и чрезвычайно разнообразные в морфологическом отношении. В отличие от настоящей оболочки домики не принимают участия в процессе деления клетки.

Известны домики как у типично планктонных (*Dinobryon*, *Kephyrion*, *Trachelomonas*, *Strombomonas*), так и у прикрепленных форм. В последнем случае домики могут быть сидячими (*Rhizolekane*, *Lagynion*, *Tylochrysis*, *Chrysocrinus*) либо прикрепляются к субстрату при помощи короткой слизистой ножки (*Derepyxis*), короткого или более-менее длинного стебелька (*Rhizaster*, *Stylochrysallis*, *Stipitococcus*), особой «подпруги» (*Chrysopyxis*).

Домик может иметь одно узкое (*Derepyxis*, *Stipitococcus*) или более менее широкое (*Dinobryon*, *Pseudokephyrion*, *Trachelomonas*, *Strombomonas*) отверстие; реже отверстий 2 (*Porostylon*, *Kephyrion*) или много, до 5–11 и более (*Heliaktis*, *Stephanoporos*, *Stipitoporos*).

Разнообразна форма домиков – округлая, эллипсоидная, яйцевидная, цилиндрическая; известны домики в виде чаши, вазы, колбы, бокала, мисочки и т. п. Стенки домиков могут быть гладкими, бесцветными либо различным образом скульптурированы (бородавки, шипики, иглы, щетинки) и окрашены за счет инкрустации соединениями железа (Fe), кальция (Ca), магния (Mg), кремния (Si).

Помимо плазмалеммы вокруг клетки могут формироваться дополнительные покровы, весьма разнообразные в разных группах водорослей.

Пелликула эвгленовых водорослей представляет собой систему, состоящую из плазмалеммы, расположенных под ней белковых полос, микротрубочек и трубчатых цистерн эндоплазматической сети. У большинства представителей *Euglenophyta* полосы начинаются от глотки и по спирали огибают всю клетку. Каждая полоса имеет рельефное очертание с утолщением (гребнем) в центре, поэтому в месте соприкосновения полос образуются глубокие борозды. За счет правильного чередования гребней и борозд вся поверхность клетки приобретает ребристый вид. В зависимости от толщины и эластичности пелликулы клетки могут метаболизировать (*Astasia*, *Euglena*, *Peranema*) либо сохранять постоянную форму (некоторые виды *Euglena*, а также *Lepocinclis*, *Phacus*, *Rhabdomonas*).

Перипласт в качестве клеточного покрова указывается для ряда представителей *Chrysophyta*, *Xanthophyta*, *Chlorophyta*, однако в деталях этот тип клеточного покрова изучен только для *Cryptophyta* (где он характерен для подавляющего большинства видов). Перипласт криптофитовых представляет собой систему, включающую плазмалемму и белковый комплекс, расположенный по обе стороны плазмалеммы. Оба белковых слоя плотно прилегают к плазмалемме, имеют многочисленные поры и состоят из пластинчатых структур, собранных в правильные ряды. На поверхности клеток, кроме того, могут располагаться семиугольные розеточные органические чешуйки.

Тека (амфиесма) динофитовых является сложной многокомпонентной системой, включающей плазмалемму, слой залегающих под ней сильно уплощенных пузырьков (альвеол)

и нижележащий слой микротрубочек. Число пузырьков варьирует от двух (*Prorocentrum*, *Exuviella*) до нескольких сотен (*Gymnodinium*, *Gyrodinium*) на клетку. Иногда пузырьки отстоят на расстоянии (*Oxyrrhis*), но чаще плотно прилегают друг к другу. В одних случаях пузырьки содержат аморфную или зернистую массу (*Amphidinium*, *Oxyrrhis*, *Gymnodinium*), в других – еще и пластинки (*Ceratium*, *Glenodinium*, *Peridinium*, *Woloszynskia*) из целлюлозы и других полисахаридов.

У водорослей известно также появление на поверхности клетки своеобразных покровных структур – **чешуек**, располагающихся обычно снаружи от плазмалеммы. По химическому составу чешуйки могут быть органическими (*Chlorophyta*, *Chrysophyta*, *Cryptophyta*) и минеральными – известковые (*Hymenomonas*) и кремниевые (*Dictyocha*). В составе органических чешуек известны хитин, целлюлоза, глюкан, пектиновые вещества, белки и др. Лежат чешуйки обособленно или налегают друг на друга; иногда могут группироваться рядами и слоями и погружаться в пектин. Плотная упаковка и срастание чешуек приводят к образованию вокруг клеток своеобразного панциря (*Tetraselmis*, *Scherffelia*, *Synura*, *Mallomonas*).

Для клеточных покровов типа перипласта, пелликулы, теки и чешуек характерно наличие особых **стрекательных (эджективных) структур**, в деталях отличающихся у представителей разных систематических групп и имеющих разное название: трихоцисты (*Dinophyta*), эджектосомы (*Cryptophyta*), дискоболоцисты (*Chrysophyta*). В общем плане подобные структуры имеют вид окруженных одиночной мембраной камер, в которых находятся свернутые в виде спирали стрекательные нити. При раздражении или экстремальных изменениях условий среды (температура, соленость, освещенность и др.) нити раскручиваются и выстреливаются наружу, резко изменяя направление движения клетки («скачок»).

Настоящая **клеточная оболочка** у водорослей представляет большое разнообразие как по химическому составу, так и в отношении ультраструктуры. Клеточный покров (клеточная стенка) в виде полисахаридных оболочек наиболее удачно сочетает защитную и опорную функцию с проницае-

мостью для воды с растворенными в ней веществами и легко пропускающей солнечный свет. Это обеспечило широкое распространение подобного типа клеточного покрова у большинства низших и наличие в качестве единственного – у высших растений. Вместе с тем, появление оболочки как наиболее совершенного типа клеточного покрова у представителей растительной формы жизни явилось результатом длительного и сложного процесса становления и отбора.

Сравнение представителей из разных систематических групп или видов в пределах одной группы водорослей, но с разным уровнем организации позволяет выявить все многообразие оболочек по морфологии, ультраструктуре и химическому составу.

В общем плане строения оболочки у водорослей сходны с таковыми у высших растений и включают аморфный матрикс и структурный компонент. Отличительной особенностью оболочек водорослевых клеток от высших наземных растений, помимо сложного набора полисахаридов, является отсутствие лигнина.

Аморфный матрикс чаще всего состоит из пектиновых веществ – разветвленных сильногидратированных полимеров. Помимо пектиновых веществ в матриксе содержатся соли альгиновой кислоты и фуканы (*Phaeophyta*) или матрикс состоит только из галактанов – агар, каррагинаны и др. (*Rhodophyta*).

Составляющие матрикс соединения в водной среде формируют слой слизи, что представляет надежную защиту, прежде всего, от высыхания при колебаниях уровня воды. Слизь, обладая плохой теплопроводностью, защищает клетки от перепадов температуры, а также от механических повреждений в текущей воде. Вместе с тем, выполняя защитную функцию, достаточную в водной среде, слизь – аморфный матрикс – не способна выполнять опорную механическую функцию, функцию своеобразного наружного скелета растительной клетки. Эту функцию выполняет структурный компонент оболочки, представленный гемицеллюлозами, целлюлозой (*Chlorophyta*, *Xanthophyta*, *Rhodophyta*, *Phaeophyta*). У ряда представителей (*Cladophora*, *Oedogonium*) в оболочках в каче-

стве структурного компонента присутствует хитин; известен также муреин при незначительных количествах целлюлозы (*Cyanophyta*).

У значительного числа представителей, лишенных скелетных полисахаридов, механическая прочность оболочки приобретает за счет минерализации аморфного матрикса соединениями кремния (*Bacillariophyta*, *Xanthophyta*), железа (*Xanthophyta*, *Chlorophyta*, *Chrysophyta*), кальция (*Chlorophyta*). В этом случае формируются двустворчатые оболочки в виде панциря (*Bacillariophyta*) или оболочки могут состоять из двух равных (*Phacotus*, *Tribonema*) или неравных (*Ophiocytium*) частей.

Известно определенное число видов из разных систематических групп, характеризующихся способностью накапливать в оболочке, помимо структурных элементов, в качестве дополнительных компонентов кремний (*Pediastrum*), спорополленин (*Chlorella*, *Scenedesmus*, цисты *Dunaliella*), карбонат кальция (*Acetabularia*, *Chara*, *Padina*, многие виды *Rhodophyta*).

По уровню организации **ядерного аппарата** среди водорослей известны прокариоты (*Cyanophyta*, *Prochloron*, *Prochlorothrix*) и эукариоты. В пределах эукариотических водорослей у представителей разных групп (*Dinophyta*, *Euglenophyta*, *Chlorophyta*) наблюдается значительный разброс признаков в строении и поведении ядер (кольцевая ДНК, лишенная гистонов; постоянный синтез ДНК; отсутствие цикла спирализации хромосом и др.), что послужило основанием для выделения особой группы – мезокариот. В дальнейшем большинство авторов отказались от выделения мезокариот как обособленной группы, включая соответствующие виды в число эукариот по признаку наличия морфологически оформленного ядра.

У прокариотических водорослей ядерный эквивалент или нуклеоплазматическая область (нуклеоид, нуклеоплазма) чаще всего занимает в клетке центральное положение или, реже, сдвинута к периферии; овальной формы или сложной конфигурации; свободна от тилакоидов (*Cyanophyta*) или пронизана ими (*Prochloron*); одна или несколько в клетке (*Cyanophyta*).

Для *Cyanophyta* известно явление полигеномности (полиэнергидности). Предположительно мелкоклеточные формы чаще всего имеют один комплекс генетической информации (геном), т. е. моногеномны. Формы с крупными клетками в большинстве случаев полигеномны, при этом число геномов в клетках одного и того же вида и даже одной особи (в пределах колонии или трихома) может быть различным и зависеть от разных факторов: типа, объема, морфологии клетки, стадии деления, скорости роста в культуре и условий культивирования.

Митотический цикл у прокариот отсутствует. Цитокинез проходит после удвоения количества ДНК. Путем инвагинации плазмалеммы и внутренних слоев оболочки формируется кольцевая складка; разрастаясь в центропетальном направлении, складка смыкается наподобие ирисовой диафрагмы и формирует поперечную перегородку.

Подавляющее большинство водорослей являются эукариотами, т. е. имеют ядро как морфологически оформленную структуру. Вместе с тем, кариологические исследования даже небольшого числа (менее 5 %) известных для науки видов показали значительное разнообразие в строении и поведении ядер у водорослей. В пределах отдельных систематических групп изученность ядра колеблется от 45 % видового разнообразия (*Charales*) до 0,02 % (отдельные классы *Chlorophyta*, а также *Cryptophyta*, *Xanthophyta*, *Chrysophyta*).

Преобладают одноядерные формы, но достаточно большое число видов являются многоядерными. Чаще число ядер в клетке составляет 2–3, но может достигать нескольких десятков и даже сотен. Многоядерность у водорослей является постоянным признаком (*Sphaeroplea*, *Chara*, *Vaucheria*, *Cladophora*) или временным состоянием, связанным с размножением, процессами роста и дифференциации клеток, либо случайным при задержке цитокинеза (экстремальные факторы среды, загрязнение, условия культивирования).

Размеры ядер у водорослей в общем колеблются в широких пределах: от 0,37 мкм (*Cochlodinium*) до 150–170 мкм (*Acetabularia*). Чаще отмечены ядра от 2,0–3,0 мкм (*Chlamydomonas*, *Coelastrum*, *Microthamnion*, *Cystoseira*, *Chroomo-*

nas, Vaucheria, Phacus, Stauroneis) до 5,0–8,0 мкм (*Oedogonium, Ulothrix, Desmidium, Spirogyra, Zygnema, Callithamnion, Melosira*); нередко встречаются и более крупные ядра – до 20,0–30,0 мкм (*Closterium, Spirogyra, Vacuolaria, Euglena, Ceratium*).

Связь размеров ядра четко прослеживается только с возрастом и функциональным состоянием клетки; во всех других случаях (тип таллома, морфологическая структура, систематическая принадлежность) подобная зависимость отсутствует. Установлено также, что колебания размерных характеристик ядер у водорослей могут иметь суточную периодичность (в одной клетке!) и связаны с температурным режимом и световой экспозицией.

Форма ядер разнообразна и на протяжении жизненного цикла может меняться в зависимости от возраста и функционального состояния. Чаще встречаются округлые, овальные, линзовидные, чечевицеобразные; реже отмечены бобовидные, неправильно яйцевидные, грушевидные, веретеновидные, спиралевидные ядра. Локализация ядра в клетке у разных видов может быть постоянной или меняться. Располагается ядро в постенной цитоплазме, глубже хлоропластов, либо в центре клетки, в цитоплазматическом мостике (*Bacillariophyta, Desmidiiales*) или цитоплазматическом мешочке, подвешенном на тонких цитоплазматических тяжках (*Spirogyra*).

Ядерная оболочка образована двумя мембранами с перинуклеарным пространством между ними. Располагаются мембраны параллельно друг другу, но могут иметь при этом волнистый контур; иногда далеко отходят друг от друга, теряют параллельное расположение и образуют расширения или глубокие выпячивания (инвагинации) в цитоплазму.

В нуклеоплазме находятся ядрышки и хроматин. У водорослей может быть одно или несколько ядрышек, характеризующихся высокой лабильностью в отношении формы и размеров, положения в ядре, способности исчезать и появляться, распадаться на отдельные фрагменты и снова сливаться. Ядрышко быстро реагирует на изменения в метаболизме клетки, что особенно проявляется в условиях культуры. Хроматин в интерфазном ядре подавляющего большинства

представителей имеет равномерно рассеянный тонкогранулированный вид (деконденсированная форма); у *Dinophyta*, *Euglenophyta* и некоторых *Chlorophyta* хроматин находится в постоянно конденсированном состоянии (хромосомы) в интерфазном ядре.

Митоз у водорослей, изученных в кариологическом отношении, обнаруживает значительное разнообразие в деталях, основными из которых признаются поведение ядерной оболочки, а также наличие или отсутствие и участие в митотическом цикле базальных тел, центриолей или полярных комплексов, выполняющих сходную функцию. По совокупности признаков различают три типа митозов:

- закрытый – ядерная оболочка сохраняется на протяжении всего митоза; центриоли отсутствуют (*Dinophyta*, *Chrysophyta*, *Euglenophyta*) или имеются (*Dinophyta*, *Chrysophyta*, *Xanthophyta*, *Chlorophyta*);

- полузакрытый – в ядерной оболочке возникают полярные отверстия, центриоли имеются (*Xanthophyta*, *Phaeophyta*, *Chlorophyta*) или отсутствуют (*Chlorophyta*); отмечены базальные тела (*Chrysophyta*, *Vacuolaria*) или полярные комплексы (*Rhodophyta*, *Bacillariophyta*);

- открытый – ядерная оболочка исчезает, в митотическом цикле участвуют центриоли (*Chlorophyta*) или базальные тела (*Cryptophyta*, *Chrysophyta*).

Цитокинез у водорослей также отличается значительным разнообразием, при этом деление протопласта может происходить путем разрастания борозды дробления или образования клеточной пластинки с участием фрагмопласта или фикопласта. Борозда дробления формируется путем инвагинации плазмалеммы и дальнейшего центропетального (к центру) разрастания. Клеточная (срединная) пластинка возникает за счет слияния пузырьков – дериватов диктиосом и дальнейшего центрифугального (к периферии) разрастания. Оба способа деления протопласта сочетаются с образованием системы микротрубочек, перпендикулярных (фрагмопласт) или параллельных (фикопласт) плоскости цитокинеза. Способы деления протопласта при всем разнообразии в деталях можно свести к пяти основным типам:

- борозда дробления без фико- или фрагмопласта;
- борозда дробления с фикопластом;
- борозда дробления с фрагмопластом;
- срединная пластинка с фикопластом;
- срединная пластинка с фрагмопластом.

Все типы митоза и цитокинеза известны в разных филах водорослей.

Фотосинтетический аппарат. Водоросли являются именно той группой первичноводных организмов, в пределах которой возник и закрепился аппарат фотосинтеза. Об этом, в частности, свидетельствует разный уровень организации этого аппарата и разнообразие ультраструктурной организации морфологически оформленных хлоропластов¹.

У подавляющего большинства видов водорослей **хлоропласт** присутствует в клетке как морфологически оформленная структура. Водоросли отличаются значительным разнообразием формы хлоропластов, их числа и местоположения в клетке, окраски и ультраструктуры. При этом разнообразие наблюдается, как правило, в пределах большинства крупных систематических групп. На видовом уровне большинство перечисленных признаков стабильны, и в условиях природных популяций изменения числа, формы и окраски хлоропластов связаны с ростом или делением клетки либо имеют возрастной характер (обусловлены старением).

По местоположению в клетке различают осевые (центральные) и парietальные (пристенные) хлоропласты. Осевые хлоропласты занимают центр клетки и обычно более массивные, парietальные располагаются в постенном слое цитоплазмы и, как правило, более мелкие либо имеют уплощенную фор-

¹ До середины XIX ст. все окрашенные цитоплазматические частицы (пластиды) называли хроматофорами. После введения Э. Страсбургером термина **хлоропласт**, термин **хроматофор** продолжали использовать только для водорослей. С середины 60-х годов XX ст. в связи с увеличением числа работ по физиологии и биохимии водорослей в научной литературе все чаще стали использовать термин **хлоропласт**, как унифицированное название структуры, содержащей хлорофилл и выполняющей функцию фотосинтеза. Термин **хроматофор** является устаревшим и не используется в работах, посвященных фотосинтезирующим растениям.

му. Оба типа расположения хлоропластов встречаются в разных систематических группах, хотя есть и исключения. Так, для *Bacillariophyta* характерны исключительно парietальные хлоропласты, у *Desmidiaceae* – преобладают осевые.

Чашевидные хлоропласты с массивным дном и тонким цельным (*Chlamydomonadales*, *Chromulina*, *Micractinium*) или лопастным (*Arachnoidochloris*) краем характерны для вегетативных, но часто встречаются и у репродуктивных (зооспоры, гаметы) клеток. При отсутствии массивного дна хлоропласт приобретает форму колокола (*Rhizochrysidopsis*).

Известны хлоропласты в виде звезды (*Arachnoidochloris*, *Ophiocytium*, *Zygnema*), замкнутого кольца (*Ellipsoidion*, *Thallochrysis*, *Ulothrix*), цилиндра (*Monomastix*), сеточки (*Chlorothecium*, *Chrysopsis*), короткой (*Bumilleria*, *Chromulina*, *Tribonema*) или длинной спирально извитой ленты (*Spirogyra*).

Наибольшим разнообразием характеризуются пластинчатые хлоропласты, имеющие вид простой цельной пластинки (*Dinobryon*, *Mallomonas*, *Mougeotia*), пластинки с более или менее загибающимися краями в виде корыта, полукольца, лопасти винта (*Chromulina*, *Chrysococcus*, *Cryptomonas*, *Monodus*, *Stipitochrysis*), с перемычкой в виде буквы Н (*Chlamydomonas*, *Tribonema*) либо продырявленной пластинки (*Cladophora*, *Oedogonium*).

Достаточно часто встречаются дисковидные хлоропласты небольших размеров, число которых в клетке может составлять от 5–8 до 100 и более (*Cyanomonas*, *Euglena*, *Tribonema*, *Vacuolaria*, *Vaucheria*).

Основным элементом мембранной фотосинтезирующей системы хлоропластов водорослей (компарментом, где происходят фотохимические реакции) являются **тилакоиды** (диски) – сильно уплощенные окруженные мембраной пузырьки, содержащие хлорофилл и каротиноиды. В случае отсутствия морфологически оформленного хлоропласта одиночные тилакоиды (*Cyanophyta*) или 2-тилакоидные пачки (*Prochloron*) свободно лежат в цитоплазме.

В строме (матриксе) морфологически оформленных хлоропластов тилакоиды могут располагаться одиночно (*Rhodophyta*) либо быть собранными в пачки по 2 (*Cryptophyta*), по

3 (*Dinophyta*, *Euglenophyta*, *Chrysophyta*, *Xanthophyta*, *Bacillariophyta*, *Phaeophyta*), от 5 до 20 и более (*Chlorophyta*).

Обычно между соседними тилакоидами внутри пачек сохраняются промежутки. Увеличение числа тилакоидов в пачках сопровождается их укорочением и более тесным расположением. Пачки иногда называют ламеллами; в случае когда пространство между тилакоидами исчезает, используют термин грани. У представителей с трехтилакоидными ламеллами имеются периферические (опоясывающие) тилакоиды, идущие параллельно оболочке хлоропласта.

Способ организации ламеллярной системы у водорослей не является раз и навсегда заданным признаком хлоропласта: число тилакоидов в пачке, их размеры и ориентация могут варьировать даже у особей одного вида в зависимости от возраста органеллы (по мере старения число тилакоидов в пачке и их толщина увеличиваются), а также различных внешних факторов, в особенности от состава питательной среды, температуры, интенсивности и качества света.

Оболочка хлоропласта образована двумя параллельными мембранами (*Rhodophyta*, *Chlorophyta*). Кроме того, хлоропласт может быть окружен снаружи каналом эндоплазматической сети, что создает впечатление четырехмембранной системы вокруг хлоропластов (*Cryptophyta*, *Chrysophyta*, *Xanthophyta*, *Bacillariophyta*, *Phaeophyta*). У представителей *Dinophyta* и *Euglenophyta* канал эндоплазматической сети одной своей стенкой настолько плотно прилегает к наружной мембране оболочки хлоропласта, что создается впечатление наличия вокруг него трехмембранной системы. Через каналы эндоплазматической сети хлоропласт связан с ядром и находится под его контролем.

У подавляющего большинства изученных в этом отношении видов водорослей хлоропласты содержат внутрипластидную ДНК в виде кольцевых микрофибрилл, не имеющих гистонов (основных белков) и прикрепленных к мембранам хлоропластов. Скопления ДНК (генофоры) могут быть беспорядочно рассеяны в строме хлоропласта (*Rhodophyta*, *Cryptophyta*, *Dinophyta*, *Xanthophyta*, *Chlorophyta*) или собраны в виде кольца под опоясывающей ламеллой (*Chrysophyta*,

Xanthophyta, *Bacillariophyta*); для *Euglenophyta* известны оба способа расположения генофоров: и рассеянный, и локализованный в виде кольца.

В хлоропластах имеются особые включения – **пиреноиды**, известные хотя и не у всех видов, но во всех систематических группах водорослей (за исключением *Cyanophyta*) и не известные у высших растений (за исключением *Anthocerotales*). По отношению к строению хлоропласта различают пиреноиды погруженные (полностью находящиеся в строении хлоропласта), полупогруженные (частично выступающие) и стебельчатые (связанные с хлоропластом одной или несколькими «ножками»). Строма пиреноида не отграничена мембраной от стромы хлоропласта и отличается от последней более высокой электронной плотностью и гомогенностью. Ламеллярная система в пиреноидах имеется либо отсутствует; расположение тилакоидов в случае их наличия может быть различным. Условной границей пиреноида служит сильно преломляющая свет обкладка, благодаря которой пиреноид хорошо различим в живых клетках. Формируется обкладка за счет отложения вокруг пиреноида запасных продуктов; при отсутствии обкладки говорят о голых пиреноидах, обнаружить которые удастся только специальными методами (окраска по Альтману либо уксусным азокармином G). Как правило, в хлоропласте имеется один пиреноид, реже их бывает несколько: от 2–4 (*Cryptomonas*, *Cosmarium*) до 20 и более, особенно у форм с центральным массивным (*Closterium*, *Pleurotaenium*) или крупным пристенным (*Cladophora*, *Oedogonium*) хлоропластом. Установлено, что в пиреноиде локализуется ключевой фермент фотосинтетической ассимиляции CO_2 – рибулозобисфосфаткарбоксилаза (РБФК, Rubisco). Предполагают, что пиреноид играет роль в механизме концентрирования CO_2 в клетках водорослей, хотя его роль в нем окончательно не установлена.

В матриксе хлоропласта находятся также рассеянные хлоропластные рибосомы, микротрубочки, метаболические гранулы.

В деталях строения оболочки хлоропластов, расположения тилакоидов и фибрилл ДНК, формы пиреноидов, места образо-

вания и отложения запасных полисахаридов хлоропласты водорослей сохраняют достаточно постоянные различия у видов разных систематических групп. Это используется, наряду с набором пигментов, химической природой запасных продуктов и строением жгутикового аппарата в качестве таксономических признаков при выделении отделов водорослей (табл. 1).

Характерной отличительной особенностью водорослей является очень широкий спектр окраски хлоропластов – от чисто зеленого, желтого, красного и синего до широкой палитры переходов и оттенков смешения этих цветов. Такой диапазон окраски хлоропластов обусловлен сложным составом пигментов, известных у водорослей. В химическом отношении **пигменты водорослей** относятся к трем группам – хлорофиллы, каротиноиды и фикобилипротеиды.

Молекула основного фотосинтетического пигмента, хлорофилла, представляет собой магний-порфирин, четыре пиррольных кольца которого несут различные радикалы, в частности, остаток пропионовой кислоты, этерифицированный длинноцепочечным спиртом фитолом.

Несмотря на то, что зеленый цвет хлорофилла у представителей большинства отделов водорослей маскируется и модифицируется другими фотосинтетическими пигментами, все водоросли содержат значительные количества хлорофилла **a** – основного фотосинтетического пигмента. У рода *Prochlorococcus* обнаружена форма хлорофилла **a** – хлорофилл a_2 , отличающийся строением молекулы (8-винил-хлорофилл **a**).

Молекулы дополнительных хлорофиллов отличаются от молекулы хлорофилла **a** некоторыми радикалами и спектром поглощения. Сочетание основного и дополнительного хлорофиллов расширяет спектр действия фотосинтеза и повышает его эффективность.

Наличие и тип дополнительного хлорофилла является определяющим признаком для выделения магистральных линий эволюционного развития водорослей – фил. Дополнительные хлорофиллы отсутствуют у *Cyanophyta*. Хлорофилл **b** типичен для *Chlorophyta* и *Euglenophyta* (фила *Chlorophyta*), а также для рода *Prochloron* (у близкого рода *Prochlorococcus* – 8-винил-хлорофилл **b**). Хлорофиллы **c**-типа, не имеющие фи-

тола, определяют филу *Chromophyta* (*Dinophyta*, *Cryptophyta*, *Chrysophyta*, *Xanthophyta*, *Bacillariophyta*, *Phaeophyta*). Два типа хлорофилла *c* (*c*₁ и *c*₂) выявлены у большинства исследованных видов *Chrysophyta*, *Xanthophyta*, *Bacillariophyta* и *Phaeophyta*, только хлорофилл *c*₂ – у большинства *Dinophyta* и *Cryptophyta* (табл. 2, с. 28).

Дополнительные хлорофиллы не выявлены у некоторых видов *Chrysophyta* (*Chrysosphaerella brevispina*), *Xanthophyta* (*Nannochloropsis*, *Monallantus*) и большинства *Rhodophyta*. Только хлорофилл *c*₁ в качестве дополнительного был обнаружен у *Synura* и у *Mallomonas* (*Chrysophyta*), а хлорофилл *c*₂ – у некоторых видов *Nitzschia* (*Bacillariophyta*). Напротив, оказалось, что *Peridinium foliaceum* (*Dinophyta*) и *Chroomonas mesostigmatica* (*Cryptophyta*) содержат как *c*₂, так и *c*₁ хлорофилл.

Каротиноиды водорослей чрезвычайно разнообразны и представлены более чем 100 пигментами различной молекулярной структуры. Каротиноиды делятся на 2 группы:

- каротины – тетратерпеновые (C₄₀) углеводороды;
- ксантофиллы – окисленные производные каротинов.

Каротины водорослей могут быть ациклическими (терминальные группы обозначаются как ψ-группы) или иметь на концах молекулы одно или два кольца β- или ε-иона. Все водоросли (без исключения!) содержат β-каротин (β,β-каротин), молекула которого симметрична и содержит 2 кольца β-иона. Его изомеры α-каротин (β,ε-каротин), ε-каротин (ε,ε-каротин) и моноциклический γ-каротин (β,ψ-каротин) имеют более ограниченное распространение (табл. 2, с. 28).

Молекулы ксантофиллов отличаются количеством и положением окси-, эпокси- и кетогрупп, могут содержать ацетиленовые и алленовые группировки, быть гликозилированными или ацетилированными. Особенности состава каротиноидов в основном коррелируют с наличием и типом дополнительного хлорофилла. В распределении каротиноидов между крупными систематическими группами водорослей наблюдаются следующие особенности (табл. 2, с. 28):

1. У *Cyanophyta* нет ε-каротиноидов (в частности, α-криптоксантина и лютеина), эпоксикаротиноидов (кроме очень ред-

ко встречающегося мутадохрома), алленовых и ацетиленовых каротиноидов. Для них характерны гликозиды ациклических и моноциклических каротиноидов (миксоксантофилл). Виды *Cyanophyta*, в отличие от представителей других групп, существенно различаются между собой по составу каротиноидов.

2. *Dinophyta* содержат либо перидинин (C_{37} -каротиноид уникальной структуры), либо, реже, фукоксантин.

3. У *Cryptophyta* нет эпокси- и алленовых каротиноидов, присутствуют ацетиленовые каротиноиды.

4. У *Rhodophyta* эпокси- и алленовые каротиноиды встречаются очень редко, ацетиленовые каротиноиды отсутствуют.

5. Для всех водорослей филы *Chromophyta* характерны алленовые каротиноиды (кроме *Cryptophyta*), а также ксантофиллы с гидрокси-группой при 19-м атоме углерода (например, вошериаксантин *Xanthophyta*) и кето-группой при 8-м атоме углерода (фукоксантин).

6. Для всех водорослей филы *Chromophyta*, а также отдела *Euglenophyta* характерны ацетиленовые каротиноиды.

7. У представителей отдела *Chlorophyta* отсутствует способность синтезировать ацетиленовые каротиноиды.

Каротиноиды в хлоропластах, помимо светособирающей функции (лютеин, фукоксантин, перидинин), выполняют функцию защиты хлорофиллов от фотоокисления (эпокси-каротиноиды виолаксантинового и диадино-диатоксантинового цикла, цикл лютеин-лютеинэпоксид у *Dunaliella*). Каротиноиды обнаруживаются также в составе стигм водорослей и играют роль в фототаксисе (эхиненон, кантаксантин) водорослей.

Для ряда видов, не связанных тесным систематическим родством (*Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis*, *Chlamydomonas nivalis*, *Trentepohlia aurea*, *Protosiphon botrioides* и другие), характерно накопление внепластидных, так называемых вторичных каротиноидов (β -каротина, эхиненона, кантаксантина, атаксантина). Часто они окрашивают клетки в яркий оранжевый и красный цвет. Массовое развитие этих видов (обитателей экстремальных местообитаний) вызывает красное «цветение».

Функция вторичных каротиноидов окончательно не установлена. Предполагается, что они могут выполнять защит-

ную фотоэкранирующую или антиоксидантную функцию, быть предшественниками специфического компонента клеточных стенок некоторых водорослей (спорополленина) или регуляторных молекул (феромонов), а также сочетать несколько функций. В культуре накопление вторичных каротиноидов вызывают, помещая водоросли в условия дефицита азота (табл. 2, с. 28).

Молекулы фикобилипротеидов состоят из тетрапиррольной пигментной группировки – хромофора (фикобилина), напоминающей разомкнутое порфириновое кольцо хлорофиллов, и ковалентно связанной с ней молекулой белка (билипротеина). Фикобилипротеиды характерны для 3 отделов водорослей (*Cyanophyta*, *Cryptophyta*, *Rhodophyta*) и выполняют функцию дополнительных светособирающих пигментов.

Основные классы фикобилипротеидов выделяют по спектру поглощения: фикоэритрин (545–575 нм), фикоэритроцианин (595–635 нм), фикоцианин (575–645 нм) и аллофикоцианин (590–654 нм). Внутри каждого класса фикобилипротеиды различаются типом билина, структурой белковой части и максимумом в спектре поглощения. Роль белковой части молекулы состоит в стабилизации трехмерной структуры билиновой группировки в различных конформациях, что обеспечивает разнообразие спектральных свойств фикобилипротеидов, а также эффективную передачу поглощенной энергии молекулам хлорофиллов.

Фикобилипротеиды *Cyanophyta* и *Rhodophyta* сходны, в то время как у *Cryptophyta* они довольно специфичны (таблица). Фикобилипротеиды *Cyanophyta* и *Rhodophyta* образуют надмолекулярные комплексы – фикобилисомы, локализованные на наружной поверхности тилакоидных мембран. У *Cryptophyta* фикобилипротеиды не образуют фикобилисом, а локализованы внутри тилакоидов в виде палочковидных структур.

Исследования пигментного состава и химической структуры пигментов водорослей нельзя считать завершенными, они продолжаются и остаются одним из актуальных направлений альгологии. При этом необходимо иметь в виду, что:

- сложность получения природного аксеничного материала для химического анализа;

- использование в анализе только лабораторных штаммов;
- методические трудности выделения хлорофиллов в нативном состоянии и их разделения на индивидуальные фракции;
- зависимость содержания фотосинтетических пигментов от интенсивности освещения и спектрального состава света (комплементарная хроматическая адаптация)

часто приводят к спорным и дискуссионным моментам в характеристике пигментных комплексов отдельных представителей различных систематических групп. Так, например, в настоящее время общепризнано, что хлорофилл *e*, идентифицированный у сборного вида *Tribonema bombycina* (*Xanthophyta*), представляет собой артефакт выделения и не существует в природе. Обнаружение у ряда видов *Chrysophyta*, *Xanthophyta* и *Bacillariophyta* новой формы хлорофилла *c* – *c*₃ было признано в некоторых случаях результатом методической ошибки.

Еще один тип хлорофилла, хлорофилл *d*, в незначительных количествах, был найден у нескольких видов глубоководных представителей *Rhodophyta* (*Girgartinia agardhii*, *Erythrophyllum delesserioides* и некоторых других). Хлорофилл *d* по строению молекулы оказался близок к хлорофиллу *a* и отличается от него всего одним заместителем (3-формил-вместо 3-винил-радикала), а также спектральными свойствами: он поглощает свет в длинноволновой области, близкой к инфракрасному излучению, проникающий на глубину. Обнаружение хлорофилла *d* подтверждалось не всеми авторами даже у тех видов, из которых он был выделен первоначально, и не обнаруживался у других морских и пресноводных *Rhodophyta*. Это привело исследователей к мысли, что хлорофилл *d* является дериватом хлорофилла *a*, образующимся в процессе экстракции. Затем, в симбиотическом комплексе асцидий была описана прокариотическая водоросль *Acaryochloris marina*, в составе пигментов которой преобладал хлорофилл *d* (>90 %, хлорофилл *a* – 10 %). Дальнейшие исследования показали, что содержащие хлорофилл *d* прокариотические водоросли довольно широко распространены и обитают в условиях недостатка видимого света:

1) на поверхности глубоководных талломов *Rhodophyta* (при детальном изучении поверхности талломов *Ahnfeltiopsis flabelliformis* (*Rhodophyta*) были обнаружены эпифитные прокариотические водоросли, которые содержали хлорофилл *d*, в то время как в соседних участках таллома макроводоросли этот пигмент не обнаруживался);

2) в нижней затененной части туник асцидий;

3) в эвтрофных соленых озерах на значительной глубине в толще фитопланктона.

Это дает основания предполагать, что первоначальное обнаружение хлорофилла *d* у представителей *Rhodophyta* было обусловлено загрязнением материала содержащими хлорофилл *d* эпифитными водорослями.

Таблица 2

Фотосинтетические пигменты отделов водорослей

| | Цианопхита | Динофита | Криптофита | Родопхита | Хризопхита | Хантофита | Бацилариопхита | Фаеопхита | Еугленопхита | Хлорофита |
|---------------------------------------|------------|------------------|------------------|-----------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------|-----------|
| ХЛОРОФИЛЛЫ: | a | a+c ₂ | a+c ₂ | a+d? | a+c ₁ +c ₂ | a+c ₁ +c ₂ | a+c ₁ +c ₂ | a+c ₁ +c ₂ | a+b | a+b |
| КАРОТИНЫ: | | | | | | | | | | |
| β-каротин | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| α-каротин | - | - | + | + | + | r | + | + | - | + |
| ε-каротин | - | - | + | - | - | - | + | + | - | r |
| γ-каротин | + | r | - | - | - | - | - | - | - | r |
| КСАНТОФИЛЛЫ: | | | | | | | | | | |
| • ПОЛИЕНОВЫЕ: | | | | | | | | | | |
| • • моноциклические рамнозиды: | | | | | | | | | | |
| миксоксантофилл | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| афанизофилл | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| осциллаксантин | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| • • моногидрокси-: | | | | | | | | | | |
| β-криптоксантин | + | - | - | r | + | - | - | - | + | r |
| α-криптоксантин | - | - | - | r | - | - | - | - | - | - |
| • • дигидрокси-: | | | | | | | | | | |
| зеаксантин | + | - | + | + | + | r | - | + | + | + |
| лютеин | - | - | - | + | - | - | - | - | - | + |

| | | | | | | | | | | |
|--|----|---|---|----|----|---|---|---|----------|--------------------|
| ••тригидрокси-: калоксантин | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ••тетрагидрокси-: ностоксантин | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ••кетокаротиноиды: эхиненон | + | - | - | - | + | + | - | - | в стигме | N |
| кантаксантин | + | - | - | - | + | + | - | - | | |
| астаксантин | - | r | - | - | - | + | - | - | в | N |
| сифоноксантин | - | - | - | - | - | - | - | - | - | r (Siphonophyceae) |
| ••ацилированные кетокаротиноиды: сифонеин | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| ••эпоксикаротиноиды: мутатоксид | rr | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| •••виолаксантиновый цикл: | - | - | - | rr | + | r | - | + | - | + |
| антераксантин | - | - | - | rr | + | r | - | + | - | + |
| виолаксантин | - | - | - | rr | + | r | - | + | - | + |
| •АЛЛЕНОВЫЕ: | - | - | - | rr | + | + | + | + | + | + |
| ••эпоксикаротиноиды: неоксантин | - | - | - | rr | + | + | + | + | + | + |
| вошериаксантин | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| •••ацетилированные: диноксантин | - | + | - | - | rr | - | - | - | - | - |
| •••кетокаротиноиды: перидинин | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| фукоксантин | - | r | - | - | + | - | + | + | - | - |
| •АЦЕТИЛЕНОВЫЕ: | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| ••моногидрокси-: крококсантин | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| ••дигидрокси-: монадоксантин | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| аллоксантин | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| диатоксантин | - | + | + | - | + | + | + | + | + | - |
| •тетрагидрокси-: гетероксантин | - | - | - | - | - | + | - | - | + | - |
| •эпоксикаротиноиды: •••диато-диатино ксантиновый цикл: | - | + | - | - | + | + | + | + | + | - |
| диатиноксантин | - | + | - | - | + | + | + | + | + | - |
| •••ацетилированные: •••кетокаротиноиды: пирроксантин | - | r | - | - | - | - | - | - | - | - |

| | | | | | | | | | | |
|--|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| БИЛИПРОТЕИДЫ: | + | - | + | + | - | - | - | - | - | - |
| с фикоцианобилином: аллофикоцианин аллофикоцианин-В С-фикоцианин R-фикоцианин фикоэритроцианин фикоцианин 569 фикоцианин 612 фикоцианин 645 | + | - | + | + | - | - | - | - | - | - |
| с фикоэритробилином: R-фикоцианин B-фикоэритрин C-фикоэритрин CU-фикоэритрин фикоэритрин 545 фикоэритрин 566 | + | - | + | + | - | - | - | - | - | - |
| с фикобиливиолином (криптовииолином): фикоцианин 612 фикоцианин 645 фикоэритрин 545 фикоэритроцианин | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| с фикоуробилином: B-фикоэритрин CU-фикоэритрин R-фикоэритрин | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| с дигидробиливердином: | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| с мезобиливердином: | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| с билином 584: фикоцианин 569 | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| с билином 618: | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| с билином 697: фикоцианин 645 | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - |

Примечания: «+» – обнаружен, «-» – не обнаружен, «г» – встречается у небольшого числа видов, «гг» – встречается только у некоторых видов, «?» – присутствие подтверждено недостаточно либо вызывает сомнения, «N» – накапливается у некоторых видов в условиях дефицита азота.

В качестве *запасных продуктов* в клетках водорослей синтезируются и накапливаются полисахариды, масла, белки, полифосфаты, а также соединения, обнаруженные к настоящему времени в пределах отдельных групп.

Полисахариды водорослей представлены двумя группами, линейными либо отличающимися степенью ветвления:

- $\alpha(1,4)$ глюкозы характерны для *Cyanophyta* (цианофитовый крахмал), *Rhodophyta* (багрянковый крахмал), *Dinophyta* (гликоген), *Cryptophyta* (крахмал), *Chlorophyta* (крахмал);
- $\beta(1,3)$ глюкозы характерны для *Chrysophyta* (хризоламинарин), *Xanthophyta* (хризоламинарин), *Bacillariophyta* (лейкозин), *Phaeophyta* (ламинарин), *Euglenophyta* (парамилон).

Специфические белки указываются в качестве запасных продуктов для *Cyanophyta*, *Rhodophyta*, *Xanthophyta*.

Для представителей всех отделов водорослей известны масла и волютин как форма запасания фосфора в условиях водной среды обитания.

В пределах отдельных групп в составе запасных продуктов известны специфические соединения, такие как дисахарид флоридозид у *Rhodophyta*, сахароспирт маннит у *Phaeophyta*, полисахарид инулин у *Siphonales*.

Питание. Водоросли – первичные фотосинтетики нашей планеты, потомки первичных бесцветных гетеротрофов, в пределах которых появился хлорофилл и способность к фототрофному питанию. Появление фотосинтеза – качественно новой энергетики жизненных процессов – обеспечило первичным фотосинтетикам успешное развитие в условиях абиотической среды. Вместе с тем, наряду с развитием и совершенствованием фотосинтетического аппарата, водоросли сохранили от гетеротрофных предков механизмы ассимиляции экзогенных органических соединений. Сочетание автотрофного и гетеротрофного питания проявляется у водорослей в миксотрофии (смешанном питании).

Преобладание в метаболизме водорослей того или иного питания (удельный вес автотрофии или гетеротрофии) зависит от видовой принадлежности и регулируется экологическими факторами, основными из которых являются: освещенность, pH, качественный и количественный состав соединений (органических и неорганических) углерода в воде.

В природной воде в свободном состоянии всегда имеются органические вещества, доступные для водорослей (осмотро-

фов). Источники органических соединений могут иметь автохтонное (экзометаболиты водорослей и других гидробионтов, донные отложения) и аллохтонное (поступление с водосборной площади) происхождение. Наибольшее значение для водорослей имеют органические соединения углерода, присутствующие в природных водах:

- **аминокислоты** – лизин, аргинин, аспарагиновая кислота, глютаминовая кислота, треонин, серин, пролин, глицин, аланин, валин, метионин, лейцин, изолейцин, тирозин, фенилаланин, аспарат;

- **сахара** – мальтоза, сахароза, глюкоза, галактоза, фруктоза, арабиноза, рибоза и др.;

- **органические кислоты** – муравьиная, уксусная, гликолевая, молочная, пировиноградная, ацетоуксусная, глиоксиловая, α -кетоглутаровая, акриловая, масляная, пропионовая, щавелевая, фумаровая, валериановая, адипиновая, галловая, капроновая, экантовая, глутаровая, янтарная, лимонная;

- **спирты** – дульцит, маннит, сорбит, этиловый и др.

Среди водорослей известны также бесцветные гетеротрофные формы (*Dinophyta*, *Chrysophyta*, *Euglenophyta*), в том числе вторично утратившие способность к фотосинтезу (*Chilomonas*, *Astasia*, *Menoidium*, *Hyaloraphidium*) и сохранившие лейкопласты.

У одноклеточных подвижных форм может осуществляться захват твердых органических частичек, бактерий и мелкоклеточных водорослей при помощи ризо-, псевдо- или аксоподий, а также жгутиков или гаптонемы – голозойное питание (*Dinophyta*, *Cryptophyta*, *Chrysophyta*, *Xanthophyta*, *Euglenophyta*, *Chlorophyta*). У бесцветных форм голозойное питание сочетается с осмотротфным (*Gyrodinium*, *Hyaloselene*, *Protaspis*, *Peranema*, *Petalomonas*, *Notosolenus*), для окрашенных форм – с фотосинтезом (*Chromulina*, *Ochromonas*, *Lepochromulina*, *Chrysostephanosphaera*). В последнем случае «переваривание» захваченных частиц может происходить в любой части протопласта или во временных «пищеварительных» вакуолях.

Для подавляющего большинства водорослей (за исключением *Cyanophyta* и *Rhodophyta*) известны **жгутиковые стадии**, как в вегетативном, так и в репродуктивном (зооспоры, гаметы) состоянии. При едином общем плане строения жгутики представителей разных систематических групп характеризуются значительным разнообразием в деталях.

В общем плане строения жгутиковый аппарат водорослей включает: собственно жгутик (тело жгутика, свободная часть, ундулиподия), переходную зону, базальные тела (кинетосомы), жгутиковые корни (ризопласт). В ультраструктурном отношении жгутиковый аппарат детально изучен и хорошо описан в многочисленных публикациях. При этом обнаружено большое сходство в строении жгутиков не только у разных групп водорослей, но и у подвижных (жгутиковых) клеток представителей разных групп организмов, часто весьма далеких в филогенетическом отношении. Универсальность жгутикового аппарата безусловно является отражением его узкой функциональной специализации (движение в капельно-жидкой среде).

В количественном отношении клетка водорослей может иметь **1** (*Monomastix*, *Monochrysis*, *Pedinomonas*, *Nephrochloris*, *Chromulina*, *Mallomonas*, *Kephyrion*, *Phacus*, *Trachelomonas*, *Lepocinclis*), **2** (*Ochromonas*, *Synura*, *Dinobryon*, *Chlamydomonas*, *Chloromonas*, *Peridinium*, *Ceratium*), **3** (*Platyachrysis*, *Triploceras*), **4** (*Carteria*, *Didymochrysis*, *Pyramidomonas*, *Spermatozopsis*, зооспоры *Stigeoclonium*, *Ulothrix*, *Urospora*), **6–8** (*Polyblepharis*, *Schizomeris*), **несколько десятков** (зооспоры *Derbesia*, *Oedogonium*, *Vauheria*) жгутиков. При наличии большого числа жгутики могут располагаться венчиком у переднего конца (*Oedogonium*), либо равномерно по всей поверхности (*Vaucheria*) клетки.

Место прикрепления жгутиков может располагаться апикально, на переднем конце клетки (*Chlamydomonas*, *Mallomonas*), субапикально, чуть сдвинуто (*Cryptomonas*, *Ochromonas*, *Ankyloton*), латерально, сбоку (*Sennia*) или вентрально, на брюшной стороне клетки (*Peridinium*, *Ceratium*). Выходить жгутики могут из небольшой жгутиковой ямки (*Chromulina*), более заметного углубления (*Cryptomonas*), жгутиковой щели

(*Dinophyta*), резервуара, связанного с вакуольным аппаратом (*Euglenophyta*), либо от основания бугорка (выпуклости, носика) разного размера и формы у представителей разных систематических групп (*Chlamydomonas*, *Carteria*). В пределах одной систематической группы может иметь место существенное разнообразие по этим признакам (*Euglenales*, *Chloromonadales*, *Chlamydomonadales*).

Чаще всего жгутики выходят из клетки в непосредственной близости друг к другу, реже отстоят на значительном расстоянии, располагаясь по углам переднего надрезанного конца клетки (*Sphenochloris*) или каждый на своем бугорке (*Phacomonas*).

По соотношению длины жгутиков в пределах одной клетки различают равножгутиковые, или изоконтные (*Chlorophyta*), и разножгутиковые, или гетероконтные (*Chrysophyta*, *Xanthophyta*, *Bacillariophyta*, *Phaeophyta*, *Dinophyta*, *Cryptophyta*) формы; иногда изоконтные и гетероконтные формы встречаются в пределах одной группы (*Euglenophyta*). Разница в длине жгутиков у гетероконтных форм может колебаться в значительных пределах – от едва заметной (*Chilomonas*, *Chroomonas*, *Epiyxis*) до отчетливой, когда длина одного из жгутиков может превышать длину другого в 2–3 и более раз (*Ochromonas*, *Pseudokephyrion*, *Anisonema*).

У гетероконтных форм нередко наблюдаются отличия в характере движения обоих жгутиков – гетеродинамизм. Длинный жгутик, как правило (хотя имеются исключения), направлен вперед по ходу движения клетки (двигательный); короткий – обращен в сторону или назад и выполняет функцию руля (рулевой). Проявляется гетеродинамизм и в характере движений – это может быть равномерное биение (наподобие кнута), волнообразное изгибание, круговое вращение (всего тела жгутика или только его кончика) с разной скоростью и амплитудой, сжатие и распрямление по продольной оси. Как правило, характер движения жгутиков специфичен на уровне родов, а в некоторых случаях и на уровне видов. В естественных условиях обитания отклонения в характере движения жгутиков чаще всего связаны с экстремальными изменениями факторов среды (свет, температура, соленость,

кислотность) либо с определенными стадиями развития (прикрепление зооспор к субстрату, встреча гамет).

В морфологическом отношении различают изоморфные (оба жгутика одинаковые) и гетероморфные (жгутики отличаются) формы. Жгутики могут быть очень тонкими, нитевидными (*Chrysidales*); более толстыми, бичевидными (*Vacuolaria*, *Euglena*); уплощенными, в виде ленты (*Cryptochrysis*, *Peridinium*); гладкими или опушенными, покрытыми волосками (мастигонемы, ретронемы). У представителей разных систематических групп волоски располагаются на поверхности жгутика продольными параллельными рядами, одиночными или сдвоенными. Для некоторых групп, кроме того, обнаружены субмикроскопические чешуйки. У представителей разных систематических групп мастигонемы и чешуйки могут сочетаться на жгутиках в разных вариантах. В отличие от чешуек в составе клеточных покровов, жгутиковые чешуйки никогда не минерализуются, что вполне соответствует двигательной функции жгутика.

Переходная зона включает часть жгутика от верхнего конца базального тела до места основания центральных микротрубочек аксонемы, а также элементы, расположенные вокруг этого основания. Структура переходной зоны у водорослей чрезвычайно разнообразна и не ограничивается несколькими типами (поперечная пластинка, звездчатая структура, переходная спираль, переходный цилиндр), наиболее часто приводимыми в литературных источниках.

Базальные тела (кинетосомы) имеют вид полого цилиндра, стенка которого образована девятью триплетами микротрубочек. По своей ультраструктуре базальные тела идентичны центриолям и во многих случаях могут превращаться друг в друга.

Жгутиковые корни (ризопласт) состоят преимущественно из 2–4 микротрубочек и у большинства видов располагаются симметрично, образуя характерные крестообразные фигуры. Число, расположение и ультраструктура элементов ризопласта (связывающих тяжей и фибриллярных корней) в значительной степени варьируют как у представителей разных групп водорослей, так и в пределах одной группы.

У ряда представителей *Chrysophyta* (*Prymnesium*, *Chrysochromulina*) помимо жгутиков имеется особое образование – гаптонема, напоминающая жгутик, но отличающаяся по ультраструктуре. Основная функция гаптонемы – прикрепление к субстрату, а также, предположительно, участие в фаготрофии. В свернутом состоянии гаптонема имеет вид небольшого носика или хоботка, расположенного между жгутиками; в развернутом состоянии гаптонема может быть короче (*Prymnesium*) или значительно длиннее (*Chrysochromulina*) жгутиков.

У ряда представителей известны сильно редуцированные жгутики, характеризующиеся способностью к ограниченному движению (*Gloeococcus*), а также псевдоцилии – потерявшие способность к подвижности жгутиковидные образования, отличающиеся отсутствием центральной пары микротрубочек, способные достигать значительной длины и ветвиться (*Schizochlamys*, *Dicranochaete*, *Apiocystis*, *Gloeochaete*).

В условиях культуры клетки могут сбрасывать жгутики и вегетировать в неподвижном состоянии.

Органеллой водорослевой клетки, взаимосвязанной с хлоропластом и жгутиковым аппаратом, является **стигма**. В прижизненном состоянии стигма имеет вид пятна округлой, палочковидной, подкововидной, трапециевидной формы, в виде точки, запятой или неправильной формы красного или оранжевого цвета. Размеры стигмы могут заметно колебаться даже у видов одного рода.

Как правило, стигма характерна для подвижных клеток, вегетативных и репродуктивных (зооспоры, гаметы). Вместе с тем, в пределах разных систематических групп водорослей известны представители с подвижными вегетативными клетками, не имеющие стигмы (*Vacuolaria*, *Gobyostomum*, *Nephrochloris*, *Chlorokardion*, *Phacomonas*, некоторые монадные *Chlorophyta*, многие *Dinophyta* и *Cryptophyta*) и, наоборот, утратившие подвижность, но сохранившие стигму в вегетативных клетках (*Characidiopsis*, *Pleurochloridella*, *Phytodinedria*, *Stylodinium*, *Tetradinium*, *Stylosphaeridium*, *Chlorangium*, *Gloeodendron*), или стигма присутствует только в молодых клетках и с возрастом исчезает (*Porochloris tetragona*, *Chlorangiochaete*).

На ультраструктурном уровне основу стигмы составляют окрашенные, осмиофильные, тесно прилегающие друг к другу плотные глобулы разного диаметра. Тонкая структура и место локализации стигмы по отношению к хлоропласту и жгутиковому аппарату отличаются у представителей разных систематических групп. У *Chlorophyta* и *Cryptophyta* стигма расположена под оболочкой хлоропласта и состоит из большого числа глобул, сгруппированных параллельными рядами; пространственная связь со жгутиковым аппаратом не выявлена. У представителей *Chrysophyta*, *Xanthophyta*, *Phaeophyta* стигма состоит из одного ряда пигментирующих глобул и также располагается под оболочкой хлоропласта, но при этом строго взаимоориентирована со жгутиковым аппаратом через парабазальное тело. Последнее представляет собой вздутие в основании короткого жгутика и отделено от стигмы только клеточным покровом и оболочкой хлоропласта. У *Euglenophyta* стигма расположена вне хлоропласта, обособлена одиночной мембраной, состоит из нескольких десятков разных по размерам глобул; находится в непосредственной близости от жгутика, несущего парабазальное тело. У *Dinophyta* описаны наиболее сложно устроенные стигмы, расположенные вне хлоропласта, у основания жгутиков и включающие, помимо двух рядов глобул, окруженных двухмембранной оболочкой, пластинчатое или линзовидное тело и ретиноид.

В условиях культуры стигма может исчезать.

В общем плане строения **митохондрии** водорослей, как и у представителей других групп организмов, ограничены двуслойной мембраной. Внутренняя мембрана образует складки (инвагинации) – кристы, форма, число и расположение (тесное или свободное) которых варьирует в значительной степени. У водорослей известно 3 типа крист: пластинчатые (*Rhodophyta*, *Cryptophyta*, *Chlorophyta*), трубчатые (*Dinophyta*, *Chrysophyta*, *Xanthophyta*, *Bacillariophyta*, *Phaeophyta*), дисковидные (*Euglenophyta*). Матрикс митохондрий содержит рибосомы и электронно-прозрачные участки с фибриллами ДНК (кольцевой, лишенной гистонов).

Для водорослей характерна значительная вариабельность митохондрий в отношении размера, формы, числа и расположения в клетке. При этом, указанные признаки варьируют не только в пределах таксонов разного ранга (класс, порядок, семейство, род, вид), но и в одной и той же клетке в зависимости от возраста, физиологического состояния клетки и внешних факторов, в том числе условий культивирования.

Мелкие митохондрии водорослей обычно округлой или овальной формы, 0,3–1,0 мкм в диаметре. Нитевидные митохондрии могут достигать в длину 2 мкм и более при ширине 0,4 мкм; длина гигантских митохондрий в гаметах *Bryopsis* в 2 раза превышает длину самих гамет. Клетки некоторых видов водорослей содержат только одну сильно разветвленную (*Prasinophyceae*) или сетчатую (*Cryptophyta*) митохондрию – митохондрион или митохондриальный ретикулум.

Местонахождение митохондрий в клетках водорослей строго не фиксировано. Различают центральные митохондрии, располагающиеся в центре клетки под хлоропластами; периферические митохондрии локализованы по периферии клетки, у наружной поверхности хлоропласта; у монадных форм крупные митохондрии обычно локализованы в непосредственной близости от основания жгутиков.

В протопласте клеток имеются особые полости – **вакуоли**, существенно отличающиеся у представителей разных систематических и экологических групп водорослей.

Газовые вакуоли известны только у *Cyanophyta* и представляют собой совокупность плотно сомкнутых палочковидных пузырьков, окруженных ригидной белковой мембраной, проницаемой для газов. Состав и давление газов, наполняющих вакуоли, зависят от состава газов окружающей среды.

Предполагается, что главной функцией газовых вакуолей является обеспечение плавучести планктонных видов и ее регуляция при изменении условий среды (подъем к поверхности воды утром и опускание в придонные слои в полуденные часы при изменении температуры воды и освещенности). Возможно также выполнение газовыми вакуолями функции за-

щиты фотосинтетического аппарата от излишней солнечной инсоляции у амфибиальных форм.

Наличие газовых вакуолей, их размеры и расположение в клетке, постоянное присутствие в течение всего вегетационного периода или появление при определенных условиях среды или в определенных фазах онтогенеза – все эти признаки являются диагностическими на уровне видов и родов.

В условиях культуры газовые вакуоли могут исчезать.

Пульсирующие (сократительные) вакуоли характерны для пресноводных видов, у морских форм встречаются реже.

Пульсирующие вакуоли выполняют функцию осморегуляции, активно выводят излишнюю воду из клетки; известны у одноклеточных и колониальных форм амебоидной, жгутиковой и гемимонадной структур. Положение пульсирующих вакуолей в клетке стабильно и видоспецифично. Чаще это 1–2 вакуоли в любой части клетки (*Rhizochloris*), на переднем конце в основании жгутиков (*Chlamydomonas*, *Dinobryon*) или псевдоцилий (*Tetraspora*), в заднем конце клетки (*Mallomonas*); или вакуолей несколько и они располагаются рассеянно по всему протопласту (*Chlorogonium*, *Hematococcus*, *Nautococcus*) либо в центральной части клетки, в вырезях хлоропласта (*Characiocloris*); известны также виды, имеющие систему вакуолей, включающую крупную главную вакуоль и несколько мелких подводящих вакуолей (*Vacuolaria*, *Gonyostomum*).

В выполнении функции осморегуляции участвуют особые неппульсирующие вакуоли – **пузулы**, формирующие совместно с несколькими (4–8) мелкими пульсирующими вакуолями сложный вакуольный аппарат (*Hyenomonas*, *Microglena*) либо воспринимающие клеточный сок из вакуолей через инвагинации мембраны, соприкасающихся с хлоропластом, и пассивно выводящие содержимое через узкий канал (*Dinophyta*).

У водорослей известны также центральные **вакуоли** с клеточным соком, отграниченные от цитоплазмы тонопластом (как у высших растений). Размеры вакуолей, их число и размещение в цитоплазме в большинстве случаев зависят от строения и расположения хлоропластов. У многоклеточных форм в процессе дифференциации клеток увеличивается объем

и число вакуолей; в процессе старения клеток вакуоли сливаются в одну крупную вакуоль, которая оттесняет цитоплазму с органеллами к клеточной стенке. Крупные центральные вакуоли могут пересекаться цитоплазматическими тяжами (*Spirogyra*) либо разделяться на 2 и более цитоплазматическими кольцами (*Sphaeroplea*) или мостиками (*Pinnularia*).

Вакуоли с клеточным соком содержат воду, органические и минеральные соединения, играют важную роль в регуляции осмотического давления в клетке, а также аккумулируют продукты метаболизма. У некоторых групп водорослей известны специфические вакуоли, характерные только в пределах этих групп. Таковы терминальные вакуоли с кристаллами гипса отдельных родов зеленых (*Closterium*, *Penium*, *Pleurotaenium*) или физоды бурых водорослей (*Phaeophyta*), содержащие фукозан и группирующиеся вокруг ядра или пластид чаще всего меристематических и репродуктивных клеток.

Характерной особенностью большинства видов водорослей является наличие **слизи**. Формируется слизь за счет метаморфоза пектиновых веществ оболочки либо секретируется в особых слизевых тельцах (мукоцистах) и выделяется наружу через поры. В химическом отношении слизь представляет собой смесь водорастворимых мукополисахаридов.

По консистенции слизь может быть вязкой, эластичной, хрящеподобной или мягкой, расплывающейся, очень нежной, практически не отличающейся от воды и обнаруживаемой только при специальном окрашивании. Слизь может быть гомогенной или слоистой, бесцветной или окрашенной. Все перечисленные признаки являются родо- и видоспецифическими и в природных популяциях зависят от возраста таллома и условий окружающей среды.

В условиях культуры отмечаются существенные отклонения по всем показателям.

Функции слизи у водорослей чрезвычайно разнообразны. Слизь участвует в формировании колоний (*Cyanophyta*; *Volvox*, *Diplochloris*, *Tetraspora*) и многоклеточных талломов (*Cyanophyta*; *Ulothrix*, *Geminella*, *Neonema*), а также связующего вещества, помогающего восходящим веточкам в талломах

разнонитчатой структуры сохранять вертикальное положение (*Coleochaete*, *Stigonema*).

У прикрепленных форм слизь обеспечивает плотное приращение к субстрату посредством формирования подошвы (*Koinopodion*), подушечки (*Chamaesiphon*), ножки (*Colacium*, *Chlorangium*, *Spirotaenia*, *Lepochromulina*, *Derepyxis*, *Gloeopodium*, *Mischococcus*).

У планктонных форм слизь обеспечивает парение в толще воды, формируя на концах или по углам клеток пучки нежных слизистых волосков (*Pediastrum*, *Coelastrum*, *Scenedemus*, *Stephanodiscus*) либо систему разветвленных слизистых тяжей (*Botryosphaera*, *Dictyosphaerium*).

Выделяющаяся слизь участвует в движении (*Bacillariophyta*, *Cloterium*), а также играет роль смазки при движении (*Euglena*).

Обильное выделение слизи, формирование слизистых влагалищ и капсул в случае неблагоприятных условий характерно для пальмеллевидного состояния.

1.2. Морфология

При изучении морфологического разнообразия вегетативного тела (таллома, слоевища) водорослей необходимо различать два понятия: **тип таллома** (уровень организации клетки) и **морфологическая структура** (уровень организации всего вегетативного тела).

Одноклеточный таллом представлен одной, функционально самостоятельной клеткой, т. е. выполняющей все функции клетки и самостоятельного организма. В морфологическом отношении одноклеточный таллом у водорослей представлен несколькими структурами.

Таллом **амебоидной** (ризоподиальной) структуры характерен для голых клеток, покрытых плазмалеммой (иногда с домиком), не имеющих постоянной формы и находящихся в метаболизирующем состоянии с формированием ризоподий или лобоподий. Известны такие формы среди *Dinophyta*

(*Dinamoebidinium*), *Chrysophyta* (*Chrysamoeba*, *Chrysocrinus*), *Xanthophyta* (*Rhizochloris*, *Rhizolekane*).

Таллом **жгутиковой** (монадной) структуры отличается наличием жгутиков и способностью к активному движению. Характерной особенностью одноклеточных жгутиковых форм водорослей является также разнообразие клеточных покровов – от голых клеток (*Chromulina*, *Dunaliella*, *Chlorokardion*) и форм с пелликулой (*Euglena*, *Phacus*), перипластом (*Cryptomonas*), чешуйками (*Mallomonas*), текой (*Ceratium*) до видов с типично растительной ригидной клеточной стенкой (*Chlamydomonas*, *Carteria*, *Pteromonas*).

Таллом **гемимонадной** (пальмеллоидной, капсальной, тетраспоральной, трансгрессивной) структуры характеризуется неподвижностью при сохранении в вегетативном состоянии пульсирующих вакуолей, стигмы, псевдоцилий (*Epichrysis*, *Characidiopsis*, *Pleurochloridella*, *Chlorophysema*, *Nautococcus*, *Porochloris*) – рудиментарных органелл монадных клеток.

Таллом **коккоидной** структуры характеризуется неподвижностью и наличием настоящей оболочки. Клетки коккоидной структуры отличаются большим разнообразием формы. Известны шаровидные (*Chlorella*), эллипсоидные (*Oocystis*, *Monodus*), трех-, четырех-, многоугольные плоские или подушковидные (*Tetraedron*, *Goniochloris*, *Tetraedriella*, *Treubaria*, *Tetraplektron*) клетки, а также клетки в виде колбасы (*Ophiocytium*, *Bumilleriopsis*), серпа (*Closterium*), цилиндра, параллелепипеда, клина (*Melosira*, *Navicula*, *Pinnularia*, *Gomphonema*). Причудливость очертаний одноклеточным талломам коккоидной структуры придают многочисленные выросты различной формы и размеров (*Euastrum*, *Micrasterias*, *Staurastrum*), а также орнаментация оболочки в виде шипов, щетинок, шпиков, гиалиновых волосков (*Golenkinia*, *Franceia*, *Akanthochloris*).

Колониальный таллом представляет собой комплекс из неопределенного числа клеток разных генераций, сохраняющих свою индивидуальность. Образуются колонии в результате многократного вегетативного деления клеток без последующего их разъединения. Клетки в колонии соединены

механически – за счет слипания либо плотного соединения внешними слоями оболочки, образования особых выростов оболочки в местах соприкосновения клеток, выделения слизи в виде сплошного слоя или одностороннего тяжа, либо различным образом организованной системы слизистых тяжей или метаморфизированных остатков материнских оболочек.

Отсутствие органической связи между клетками в виде пор или плазмодесм ограничивает возможности функциональной специализации клеток в пределах колонии. Вместе с тем, среди колониальных форм водорослей проявляется тенденция к морфологической и функциональной дифференциации клеток, что наиболее четко выражено в колониях с большим числом клеток (32–64–128 и более). Наиболее часто происходит дифференциация на вегетативные (абсолютное большинство клеток колонии) и репродуктивные (от 2 до 8) клетки.

Частным случаем колонии является *ценобиальный* таллом, для которого характерно постоянное, фиксированное число клеток (обычно кратное 4) одной генерации, соединенных в определенном и характерном для каждого вида порядке. У ценобиальных форм деление в период вегетации не происходит, рост ценобия происходит исключительно за счет увеличения линейных размеров без увеличения числа клеток в ценобии и без изменения их размещения и способа соединения (в отличие от колонии).

В морфологическом отношении колониальный (и ценобиальный) таллом у водорослей представлен монадной, гемимонадной и коккоидной структурами.

Колонии монадной структуры могут иметь вид легко распадающихся цепочек (*Ceratium*), кустиков (*Dinobryon*), рыхлых или плотных шаров, в которых клетки соединены в центре тонкими стебельками (*Chrysosphaerella*, *Synura*, *Raciborskiella*), грозди (*Pyrobotrys*). В случае наличия общей колониальной слизи жгутики каждой клетки выходят за пределы слизи, обеспечивая движения колонии (*Gonium*, *Pandorina*, *Eudorina*).

Колонии гемимонадной структуры, как правило, характеризуются наличием колониальной слизи неправильных очертаний (*Heterogloea*, *Chlorosaccus*, *Chrysotylus*), либо опре-

деленной формы, характерной для каждого вида (*Helminthogloea*, *Gloeochloris*, *Chrysocapsa*, *Hydrurus*, *Tetraspora*).

Колонии коккоидной структуры также весьма разнообразны в морфологическом отношении и по числу составляющих их клеток и могут формироваться как с образованием общей слизи, так и при помощи метаморфизированных остатков оболочек материнских клеток. Известны колонии с бесструктурной недифференцированной слизью с более или менее равномерно расположенными внутри клетками (*Diplochloris*, *Gloeobotrys*, *Asterogloea*, *Kirchneriella*), древовидные слизистые колонии (*Mischococcus*, *Gloeopodium*), колонии в виде слизистых трубок (*Chroodactylon*, *Cymbella*). Колонии разнообразных, часто причудливых очертаний формируются при участии остатков оболочек материнских клеток (*Coronas-trum*, *Tetrallantos*, *Dictyosphaerium*) либо при непосредственном контакте оболочек (*Actinastrum*, *Coelastrum*).

Многоклеточный таллом характеризуется большим неопределенным числом клеток, неограниченным ростом и наличием органической связи между клетками в виде пор или плазмодесм. Наличие плазмодесм объединяет клетки в единый организм и создает предпосылки для функциональной специализации и последующей морфологической дифференциации клеток в пределах таллома. Возникновение многоклеточности явилось качественно новым уровнем в морфологической эволюции водорослей и привело к формированию более высоко организованных морфологических структур.

Нитчатая (трихальная) структура является наиболее простой структурой многоклеточного таллома и состоит из одного ряда клеток, подобных друг другу и в равной степени способных к росту и делению (диффузный рост). Функциональная специализация проявляется у прикрепленных форм, когда нижняя клетка, выполняя только функцию прикрепления, превращается в ризоид (*Phaeothamnion*, *Heterodendron*, *Uronema*, *Chaetomorpha*, *Oedogonium*). Большинство клеток нити со временем теряют способность делиться, и рост нити осуществляется за счет небольших участков – зон роста (меристематическая зона). Соответственно местоположению зоны роста различают интеркалярный (зона роста в средней

части нити), апикальный (рост за счет верхушечных клеток) и базальный (зона роста в основании нити) рост таллома.

Многие представители нитчатой структуры из разных групп водорослей обладают способностью к ветвлению, что создает значительное разнообразие в качестве обычной модификации простой нитчатой структуры (*Chlorophyta*, *Phaeophyta*, *Rhodophyta*). В целом для водорослей известны все типы ветвления, характерные для растений (в том числе и высших): дихотомическое, моноподиальное, симподиальное, ложнодихотомическое.

Разнонитчатая (гетеротрихальная) структура возникла из нитчатой и характеризуется дифференциацией таллома на горизонтальную, стелющуюся по субстрату (преимущественно функция прикрепления!), и вертикальную часть, приподнимающуюся над субстратом (преимущественно функция фотосинтеза!). Талломы разнонитчатой структуры представлены в разных группах (*Rhodophyta*, *Xanthophyta*, *Phaeophyta*, *Chlorophyta*) водорослей и характеризуются значительным разнообразием вследствие редукции или чрезмерного развития одной из частей таллома.

Пластинчатая структура представлена талломами, состоящими из 1–2 (*Porphyra*, *Ulva*, *Monostroma*) или нескольких слоев клеток. Образуется пластинка в результате деления клеток в двух взаимно перпендикулярных направлениях. Вследствие расхождения слоев и формирования внутренней полости пластинчатый таллом может принимать вид трубки (*Enteromorpha*) или мешка (*Monostroma*).

Тканевая (паренхиматозная) структура характерна для крупных, сложно расчлененных талломов бурых водорослей (*Fucus*, *Laminaria*). Хотя настоящие ткани у водорослей отсутствуют, у форм с тканевой структурой наблюдается функциональная специализация групп клеток в составе многоклеточного таллома. Деление клеток в трех взаимно перпендикулярных направлениях с образованием объемных паренхимных участков таллома известно также у части наиболее высоко организованных представителей *Cyanophyta* (*Stigonema*, *Fischerella*, *Hapalosiphon*). Для *Rhodophyta* выде-

ляют ложнопаренхиматозную структуру, возникающую в результате срастания ветвей таллома нитчатой структуры.

Неклеточный таллом² характеризуется отсутствием внутренних перегородок, крупными размерами, функциональной специализацией и морфологической дифференциацией **частей** таллома. Для неклеточного таллома выделяется только одна, сифональная структура (*Botrydium*, *Vaucheria*, *Acetabularia*, *Caulerpa*, *Codium*).

Близкой к сифональной является сифонокладальная структура, выделяемая для талломов, состоящих из многоядерных сегментов (*Cladophora*). Подобная структура формируется в ходе индивидуального развития первичного неклеточного таллома как результат последующего сегрегативного деления на многоядерные участки (сегменты).

В условиях культуры характерный для вида морфологический статус часто нарушается: колониальные формы существуют в виде отдельных клеток, образуются аномальные формы (крупные размеры, нетипичная для вида форма клеток и талломов, многоядерность вследствие отставания цитокинеза от кариокинеза и т. п.).

1.3. Размножение

Размножение, или способность воспроизводить себе подобное, является одним из основных свойств живых организмов. Для водорослей, как и для растений в целом, известно три способа размножения³: вегетативное, бесполое и половое.

Вегетативное размножение – это такой способ размножения, при котором новый организм возникает из части старого. При этом старый организм либо прекращает свое существование (в случае одноклеточных форм), либо продолжает существовать.

² В литературе подобные формы иногда трактуются как одноклеточные; при этом учитывается только отсутствие внутренних перегородок при игнорировании других особенностей таллома.

³ Учитывая существующие в литературе разночтения в понимании и трактовке типов размножения, авторы сочли необходимым привести определение каждого типа размножения.

У видов с одноклеточным талломом вегетативное размножение осуществляется делением надвое. При этом ось деления может проходить в продольном направлении, от морфологически переднего к морфологически заднему концу клетки (*Euglenophyta*, *Cryptophyta*, *Chlorophyta*); известно также поперечное направление оси деления и деление наискось (*Dinophyta*).

У амебоидных форм деление может происходить в любом направлении, без втягивания (*Chrysamoeba*, *Rhizochloris*, *Brehmiella*) или с втягиванием ризо- и псевдоподий. У форм с домиком последний достается одной из дочерних клеток, другая выползает из него и образует свой собственный (*Stephanoporos*, *Rhizolekane*) новый домик.

У жгутиковых форм деление может происходить в подвижном состоянии и завершаться в течение 15 минут. Начинается деление с образования нового набора жгутиков и заканчивается полной перешнуровкой клетки надвое. У ряда видов *Volvocales* каждая из клеток получает половину имевшихся до деления жгутиков и достраивает недостающую половину. У представителей с домиком последний достается одной клетке (*Chrysococcus*, *Trachelomonas*); панцирь делится пополам, достается каждой из дочерних клеток (*Dinophyta*, *Microglana*), которые достраивают вторую половину. Деление в неподвижном состоянии сопровождается потерей жгутиков, выработкой слизистого чехла или капсулы и переходом в пальмеллевидное состояние. При неблагоприятных внешних условиях (температура, недостаток воды) разделившиеся клетки остаются внутри слизистой капсулы и только при наступлении благоприятных условий пассивно (при разжижении и расплывании слизи) либо активно (вырабатывая жгутики внутри капсулы) покидают слизь и продолжают вегетировать. Известно размножение почкованием (*Palatinella*).

У коккоидных форм деление может происходить по всем направлениям в зависимости от факторов среды, часто случайных. Для *Сyanophyta* отмечается равное и неравное деление; в отдельных случаях неравное деление напоминает почкование.

Размножение колониальных форм осуществляется делением колонии надвое (*Synura*), распадом на фрагменты (*Dino-*

bryon), выбрасыванием (*Microcystis*) или выходом (*Pandorina*) отдельных клеток из колонии в период активной вегетации, распадом колонии на отдельные клетки при расплывании или разрыве общей колониальной слизи (*Aphanothece*, *Microcystis*). У представителей *Volvocales* в составе колонии функцию вегетативного размножения выполняют специализированные клетки, обладающие (в отличие от абсолютного большинства клеток колонии) способностью к делению (*Pleodorina*, *Volvox*).

У многоклеточных форм разрастание таллома происходит за счет деления клеток в одном, двух, трех направлениях при сохранении связи между клетками через поры или плазмодесмы. Многоклеточный таллом может распадаться на фрагменты (*Oscillatoriales*, *Ulotrichales*, *Desmidiaceae*), каждый из которых продолжает вегетировать и разрастается до размеров, характерных для вида. Известно также почкование, происходящее обычно при формировании боковых ветвей (*Phaeothamnion*, *Microthamnion*, *Heterococcus*, *Ulotrichales*).

У наиболее высоко организованных форм зеленых, бурых и красных водорослей вегетативное размножение приобретает формы, близкие к таковому у высших растений. Помимо способности к регенерации частей таллома, у многих видов вегетативное размножение осуществляется специализированными образованиями: одноклеточные и многоклеточные зимующие клубеньки (*Chara*), выводковые почки (*Sphacelaria*, *Dichotomosiphon*, *Vaucheria*), дополнительные побеги и столоны (*Laminaria*, *Ecklonia*).

Клетками вегетативного размножения являются акинеты и гипноспоры, сочетающие функции размножения и перенесения неблагоприятных условий. Отличаются способом образования: акинеты формируются непосредственно из вегетативных клеток без образования новой оболочки, гипноспоры вырабатывают новую собственную оболочку, без участия оболочки вегетативной клетки, в которой они образуются. Известны акинеты у представителей *Cyanophyta*, *Xanthophyta*, *Chlorophyta* с многоклеточным талломом нитчатой, реже разнонитчатой структур. Формирование акинет связано с изменениями условий окружающей среды и может быть кратковременным (обратимым) или более длительным.

Бесполое размножение – это такой способ размножения, при котором новый организм возникает из одной гаплоидной клетки – споры. В образовании спор принимает участие только протопласт материнской клетки (спорангия), оболочка же спорангия участия в делении не принимает и сохраняет свою целостность вплоть до созревания спор.

У одноклеточных и колониальных форм вегетативная клетка непосредственно превращается в спорангий. У многоклеточных форм спорангии могут образоваться из любой вегетативной клетки таллома, либо только из апикальных клеток или клеток боковых ветвей, либо закладываются специально, выполняют только функцию спорообразования и могут отличаться формой и размерами от вегетативных клеток таллома.

Чрезвычайно разнообразно поведение оболочки спорангия в ходе освобождения (или выхода) спор; у разных видов оболочка:

- полностью или частично ослизняется;
- разламывается или разрывается на две или более частей (сегментов, участков) правильной или неправильной формы с разрушением или сохранением частей оболочки с последующим их участием в формировании колоний;
- открывается продольной или поперечной щелью, крышечкой, округлыми отверстиями апикально или латерально.

Споры могут выходить из спорангия в слизистом пузыре (лизис скелетных полисахаридов!) и оставаться вместе достаточно долго, превращаясь в вегетативные клетки внутри сильно растянутого слизистого пузыря.

Все разнообразие спор водорослей классифицируют по следующим признакам: способ образования, подвижность, число образующихся в спорангии спор.

По способу образования различают эндоспоры (образуются внутри спорангия при повторном и множественном делении протопласта) и экзоспоры (поперечное деление материнской клетки с последующим отделением споры). Экзоспоры (или беоциты) известны для *Cyanophyta*, у которых при развитии спор стенка спорангия разрывается или ослизняется на верхушке и окружает клетку, отделяющую экзоспоры (материнскую клетку), в виде влагалища.

По подвижности различают подвижные – зооспоры и неподвижные – апланоспоры. Зооспоры имеют жгутиковую структуру, могут быть голыми или иметь оболочку. Апланоспоры всегда имеют оболочку, которая формируется еще внутри спорангия. Частным случаем апланоспор являются автоспоры – точная миниатюрная копия материнской клетки. Промежуточное положение между зооспорами и апланоспорами занимают гемизооспоры и гемиавтоспоры, различия между которыми часто весьма условны и включают утрату подвижности, наличие или отсутствие оболочки, пульсирующих вакуолей и стигмы.

У большинства растений в спорангиях формируется большое число спор (как правило, кратное 4) – полиспоры. Вместе с тем, для водорослей известны виды, для которых число спор в спорангии составляет 1 (моноспоры), 2 (биспоры) или 4 (тетраспоры). Такая классификация спор принята для красных водорослей (не имеющих в жизненном цикле подвижных стадий), хотя вполне применима и для других групп.

Бесполое размножение отсутствует у *Bacillariophyta*, многих *Chlorophyta* (*Zygnematales*, *Charales*, *Siphonales*), *Phaeophyta* (*Fucales*).

Половое размножение – такой способ размножения, при котором новый организм возникает из одной диплоидной клетки (зиготы), образующейся в результате предварительного слияния двух гаплоидных клеток (гамет). Следует отметить, что в целом у водорослей половой процесс представлен достаточно разнообразно. При этом далеко не всегда есть зигота и гаметы как специализированные половые клетки, но вполне правомерно говорить о половом процессе в общебиологическом смысле при наличии следующих моментов:

- слияние гаплоидных элементов (протопластов или участков протопластов вегетативных недифференцированных клеток, либо только ядер в любых сочетаниях);
- формирование диплоидного элемента;
- образование из диплоидного элемента нового организма или приобретение организмом новых качеств и свойств.

Для водорослей известны следующие типы полового процесса:

- хологамия (гологамия);
- изогамия⁴;
- гетерогамия (анизогамия)⁴;
- оогамия⁴;
- конъюгация;
- автогамия.

Хологамия (гологамия) – половой процесс, при котором отсутствуют гаметы как специализированные клетки размножения; функцию гамет выполняют вегетативные клетки. Известен хологамный половой процесс для одноклеточных жгутиковых форм *Dinophyta*, *Chlorophyta* (*Heteromastix*, *Phyllocardium*, *Pyramidomonas*), *Chrysophyta* (*Dinobryon*).

Для трех типов полового процесса (изо-, гетеро-, оогамия) характерно наличие специализированных клеток – гамет, образующихся в гаметангиях. У подавляющего большинства водорослей гаметангии одноклеточные; исключение составляют многоклеточные гаметангии *Chlorophyta* (*Draparnaldiella*), *Phaeophyta* (*Ectocarpus*) и многоклеточные (включающие стерильные и фертильные клетки) половые органы некоторых *Chlorophyta* (*Chara*, *Nitella*).

Изогамия – половой процесс, при котором гаметы одинаковы по строению, размерам и подвижности. Ввиду отсутствия каких-либо различий изогаметы условно обозначают знаками «+» и «-». Всегда копулируют «+» гаметы и «-» гаметы, однако у разных видов наблюдаются некоторые отличия: копулировать могут гаметы, сформировавшиеся в пределах одного таллома (гомоталлические виды) либо на разных талломах (гетероталлические виды)⁵. Изогамия известна у представителей *Dinophyta*, *Chrysophyta* (*Ochrosphaera*), *Chlorophyta* (*Dunaliella*, *Chlamydomonas*, *Tetraspora*, *Ulothrix*, *Cladophora*, *Coleochaete*), *Phaeophyta* (*Ectocarpus*, *Chordaria*, *Sphacellaria*).

Гетерогамия (анизогамия) – половой процесс, при котором гаметы одинаковы по подвижности и строению, но от-

⁴ Указанные типы полового процесса разными авторами иногда объединяются под общими названиями гаметогамия (по признаку наличия гамет) или мерогамия (по признаку отличия гамет от вегетативных клеток).

⁵ В литературе понятие гомо- и гетероталлизма может смешиваться с понятиями однодомности и двудомности и даже однополости и обоеполости.

личаются по размерам. Различают мелкую более подвижную микрогамету и более крупную менее подвижную макрогамету. В целом у гетерогамных видов разница в размерах между гаметами колеблется в очень широких пределах: от едва заметной, составляющей 1–2 мкм до ощутимой и значительной. Известна гетерогамия у представителей *Dinophyta*, *Chlorophyta* (*Gonium*, *Pandorina*, *Characium*, *Chlorhormidium*, *Draparnaldia*, *Arachnochaeta*, *Codium*), *Phaeophyta* (*Culteria*).

Атактогамия – половой процесс⁶, при котором происходит беспорядочное изогамное и гетерогамное слияние гамет и хологамное слияние вегетативных клеток у одного вида в пределах одной популяции. Известна атактогамия у представителей *Chlorophyta* (*Chlamydomonas*, *Chlorogonium*, *Gonium*, *Pandorina*, *Chlorangiopsis*).

Оогамия – половой процесс, при котором гаметы отличаются по строению, размерам и подвижности. Крупные неподвижные женские гаметы – яйцеклетки, формируются в женских гаметангиях (оогониях); мелкие подвижные мужские гаметы – сперматозоиды (антерозоиды) формируются в мужских гаметангиях (антеридиях). Оогамия является наиболее совершенным типом полового процесса, доминирует в органическом мире и для многих групп это единственный способ полового процесса (а иногда и единственный способ размножения). У водорослей оогамия известна у *Xanthophyta* (*Vaucheria*), *Bacillariophyta* (*Melosira*, *Biddulphia*), *Rhodophyta* (единственный тип полового процесса), *Chlorophyta* (*Chlamydomonas*, *Volvox*, *Micractinium*, *Chara*, *Oedogonium*, *Sphaeroplea*), *Phaeophyta* (*Dictyota*, *Padina*, *Laminaria*, *Fucus*, *Sargassum*, *Cystoseira*).

Для водорослей известны также особые формы полового процесса – конъюгация и автогамия.

Конъюгация – половой процесс, при котором происходит слияние протопластов вегетативных недифференцированных клеток. Оболочка может принимать участие в процессе путем формирования особого конъюгационного канала. Известна

⁶ Открыт, детально изучен и описан в природной популяции вида *Chlamydomonas atactogama* Korsch. профессором Харьковского университета А.А. Коршиковым в 1925 году.

конъюгация у *Chlorophyta* (*Spirogyra*, *Zygnema*, *Closterium*) и *Bacillariophyta* (*Amphora*, *Epithemia*, *Pinnularia*, *Navicula*, *Surirella*, *Synedra*)⁷.

Автогамия – редуцированная форма полового процесса, при котором зигота формируется в результате слияния двух сестринских гаплоидных ядер в общей цитоплазме. Автотогамный процесс известен у *Chrysophyta* (*Dinobryon*, *Stenokalyx*, *Kephyrion*) и *Bacillariophyta* (*Melosira*).

Процессы формирования и развития зиготы весьма разнообразны в пределах разных групп водорослей. У ряда форм зигота проходит две стадии – планозиготы (сохранение подвижности и рост) и гипнозиготы (неподвижность, отсутствие активного роста, толстая оболочка и высокое содержание запасных продуктов). Стадия планозиготы (если она имеется) обычно кратковременна (от 1–2 часов до 2–3 дней) и быстро сменяется стадией гипнозиготы. Исключение составляют ряд представителей *Dinophyta*, для которых характерно формирование вегетативных клеток непосредственно из планозиготы (*Ceratium*). При отсутствии стадии планозиготы у водорослей принято говорить о зиготе⁸.

В пределах разных групп водорослей зигота после образования может прорасти (развиваться) сразу же или после более менее длительного периода покоя. Зиготы *Rhodophyta* сразу же после образования претерпевают ряд сложных превращений и формируют карпоспорангии с карпоспорами. У *Bacillariophyta* зигота без периода покоя начинает расти и превращается в ауксоспору (растущую спору), что связано с уменьшением размеров клеток в ходе вегетативного размножения. Развитие зиготы без периода покоя характерно также для представителей *Chlorophyta* (*Acetabularia*, *Cladophora*, *Codium*).

⁷ В литературе конъюгация *Bacillariophyta* разными авторами трактуется как изогамный или гетерогамный процесс в зависимости от равных или неравных размеров конъюгирующих участков протопластов вегетативных клеток (наблюдения в культуре).

⁸ Термин «зигоспора», используемый рядом авторов, совпадает с таковым для зигомических грибов и не вполне корректен в альгологических работах.

Для зигот большого числа видов характерен период покоя, составляющий обычно несколько месяцев. В целом же для водорослей период покоя зигот может составлять от нескольких дней до 1–2 месяцев, одного года и более (16 лет).

Прорастают зиготы непосредственно новыми растениями (*Vaucheria*, *Bryopsis*, *Chara*, *Zygnema*), зооспорангиями либо зооспорами (в зооспорангии превращается непосредственно сама зигота) – *Chrysophyta*, *Chlorophyta* (*Pediastrum*, *Hydrodictyon*, *Oedogonium*, *Ulothrix*).

Различные формы размножения – бесполое и половое – часто характерны для одного и того же вида, сменяя друг друга более менее регулярно. Развитие вида от одной до другой одноименной стадии (от споры до споры; от гаметы до гаметы) получило название **жизненного цикла**, и это понятие не всегда совпадает с понятием онтогенеза (индивидуального развития особи от рождения до смерти).

В обобщенном понимании для растений известны такие типы жизненных циклов:

- гаплофазный (гапобионтный);
- диплофазный (дипобионтный);
- гаплодиплофазный (гаплодипобионтный).

При гаплофазном жизненном цикле вегетативная особь всегда гаплоидна, диплоидная стадия представлена только зиготой; мейоз происходит в зиготе, при ее прорастании (зиготическая редукция). У видов, не имеющих полового процесса, диплоидная стадия отсутствует. Гаплофазный жизненный цикл широко распространен среди водорослей и характерен для *Dinophyta*, *Cryptophyta*, *Xanthophyta*, *Chrysophyta*, *Euglenophyta*, *Chlorophyta*.

При диплофазном жизненном цикле вегетативная особь всегда диплоидна, гаплоидны только гаметы. Зигота при прорастании дает диплоидное растение, мейоз происходит в гаметангиях, при формировании гамет (гаметическая редукция). Бесполое размножение отсутствует. Диплофазный жизненный цикл у растений характерен только для водорослей и является единственным у *Bacillariophyta*, известен также в пределах *Chlorophyta* (*Siphonales*, *Charales*) и *Phaeophyta* (*Fucales*).

Наиболее типичным, широко распространенным среди растений является гаплодиплофазный жизненный цикл с изоморфным или гетероморфным чередованием поколений. При этом, если у высших растений известна только гетероморфная смена поколений с регулярным их чередованием, то у водорослей известны обе формы гаплодиплофазного жизненного цикла с большим разнообразием длительности существования и регулярности чередования поколений.

При изоморфном гаплодиплофазном жизненном цикле оба поколения – и гаметофит (гаплонт) и спорофит (диплонт) – представлены сходными по внешнему и внутреннему строению талломами. Отличаются оба поколения только набором хромосом в ядрах и органами размножения (спорангии или гаметангии), которые они образуют. Место мейоза в жизненном цикле обычно строго фиксировано и происходит в спорангиях при формировании спор (спорическая редукция).

При гетероморфном гаплодиплофазном жизненном цикле спорофит и гаметофит отличаются друг от друга по внешнему и внутреннему строению, а часто и по срокам существования. У представителей из разных групп водорослей как спорофит так и гаметофит могут доминировать в цикле; могут быть микроскопическими и макроскопическими; каждый из них может быть эфемероидом и существовать только до созревания соответствующих стадий (спор или гамет), однолетником, двулетником, многолетником. У ряда видов чередование поколений происходит более или менее регулярно. Вместе с тем, известны виды, у которых одно из поколений (разное у разных видов) является постоянной формой существования, а появление другого поколения (смена формы существования) – явление редкое, нерегулярное и происходит в зависимости от экстремальных изменений условий существования (высокие или низкие температуры, засоление или опреснение воды, резкие перепады уровня воды и т. п.).

Водоросли – изоспоровые растения; все споры в спорангиях одинаковы и потенциально каждая спора может дать и женский, и мужской гаметофит. Экспериментально доказано, что формирование оогониев или антеридиев зависит от условий, в которых развивается гаметофит, а также от наличия соот-

ветствующих экзометаболитов в воде: высокая концентрация антеридиальных экзометаболитов (мужских феромонов?) подавляет появление новых антеридиев; подобная же тенденция выявлена и для оогониев.

В условиях культуры процессы деления клеток и талломов, спорообразования, гаметогенеза, прорастание спор и зигот дают значительный разброс вариантов, часто существенно отличающихся от характерных и типичных для природных популяций видов в естественных условиях обитания.

1.4. Экология и распространение

Преобладающее большинство видов водорослей обитают в водоемах: малых и больших, постоянных и эфемерных, стоячих и текучих, пресных и соленых, чистых и загрязненных. В зависимости от совокупности экологических факторов водоросли образуют альгоценозы (сообщества). Для каждого альгоценоза характерен более менее постоянный видовой состав.

Выделяют водные – фитопланктон, нейстон, фитобентос, перифитон, и вневодные – аэрофитон, фитоэдафон, эндолитофитон, ценозы водорослей. Это основные типы ценозов, в границах которых могут выделяться более мелкие группировки.

Фитопланктон – группировки водорослей, обитающих в толще воды (пелагиали) во взвешенном состоянии. Различают активных и пассивных планктеров. Активные планктеры – это жгутиковые формы, способные активно передвигаться в толще воды и сопротивляться сносу (*Ceratium*, *Peridinium*, *Cryptomonas*, *Ochromonas*, *Dinobryon*, *Mallomonas*, *Synura*, *Chlamydomonas*, *Pandorina*, *Volvox*, *Euglena*, *Trachelomonas*). У пассивных планктеров взвешенное состояние в толще воды обеспечивается разнообразными приспособлениями, направленными на уменьшение удельного веса клетки (газовые вакуоли *Cyanophyta*, выделение слизи) либо развитие разнообразных «парашютов», увеличивающих общую поверхность таллома (трение о воду!) без увеличения веса. В качестве парашютных приспособлений выступают щетинковидные выросты (*Micractinium*, *Scenedesmus*, *Golenkinia*,

Lagerheimia), расположенные в одной плоскости пластинчатые выросты (*Tetraedron*, *Pseudostaurastrum*), а также общая форма клеток и колоний в виде пластинок (*Pediastrum*, *Goniochloris*), цепочек, лент (*Fragilaria*, *Melosira*, *Aulacoseira*), звезд (*Actidesmium*, *Actinastrum*, *Asterionella*).

Нейстон – группировки водорослей, связанные с поверхностной пленкой воды и обитающие на границе водной и воздушной сред. Большинство нейстонных видов имеют специфические приспособления в виде слизистых колпачков (*Nautococcus*), плавательных пластинок с гидрофобной поверхностью (*Kremastochrysis*) и др. Обитанию в нейстоне способствуют и мелкие размеры.

Фитобентос – группировки водорослей, обитающих на дне (бентали) водоемов в свободном или прикрепленном состоянии. Бентосные формы отличаются значительной амплитудой размеров, вследствие чего принято деление на микрофитобентос (мелкие формы *Bacillariophyta*, *Cyanophyta*, *Xanthophyta*, *Chrysophyta*, *Chlorophyta*) и макрофитобентос (крупные, в основном морские формы *Rhodophyta*, *Phaeophyta*, *Chlorophyta*). Бентосные виды либо свободно лежат на поверхности донных отложений и грунта, либо прикрепляются при помощи разнообразных приспособлений: подошв, ризоидов, слизистых тяжей или подушечек.

Перифитон (обрастания) – группировки водорослей, обитающих на субстратах, погруженных в воду, как естественных (водные растения и животные), так и искусственных (гидротехнические сооружения, откосы берегов, опоры мостов, нейлоновые тросы и деревянные сваи и пр.).

Аэрофитон (воздушные водоросли) – группировки водорослей, обитающих вне воды на различных твердых субстратах: коре деревьев и обработанной древесине (заборы, крыши и стены домов), скалах, асфальте у выхода водосточных труб, постройках из кирпича и камня (жилые и промышленные здания, памятники, парапеты и т. п.). Наиболее разнообразно аэрофитон представлен в затененных местах, где дольше задерживается влага, а также в регионах с теплым влажным климатом. Необычные условия обитания отразились на представителях аэрофитона, для которых зачастую, характерны

утолщенные слоистые оболочки, слизистые чехлы и пузыри удерживающие воду, более вязкая цитоплазма, накопление в протопласте значительного количества масла.

Фитозадафон (почвенные водоросли) – группировки водорослей, обитающих на почве и в ее поверхностном слое. В активном состоянии представители фитозадафона находятся при соответствующих условиях влажности и температуры. Особенностью почвенных водорослей является способность переживать неблагоприятные условия, в первую очередь длительное высушивание, без образования специальных покоящихся стадий. Способность к миксотрофному питанию обеспечивает представителям фитозадафона возможность существования в поверхностных слоях почвы при недостатке света.

Эндолитофитон (сверлящие водоросли) – группировки водорослей, обитающих на известковых субстратах. Выделение водорослями органических кислот приводит к постепенному растворению извести, вследствие чего субстрат оказывается пронизанным тонкими глубокими канальцами – ходами. К этой группе относят водоросли, способные выделять известь и формировать отложения – туфы. Количество образующейся извести неодинаково у разных видов: немного или обильно, заключая клетки и нити в своеобразные влагиалища и, наконец, у некоторых видов таллом полностью погружен в известь. В последнем случае таллом постепенно отмирает, живыми остаются только клетки, размещенные ближе к поверхности.

Симбиотические отношения водорослей с представителями различных групп водных животных известны давно (1882) и неоднократно описаны разными авторами под названиями *Zoochlorella* (зеленые клетки) и *Zooxanthella* (желтые или коричневые клетки). В настоящее время водорослевые симбионты известны для представителей значительного числа родов инфузорий, ризопод, радиолярий, кишечнорастворимых, губок, моллюсков, плоских червей, оболочников. Детальное изучение симбионтов показало, что термины «*Zoochlorella*» и «*Zooxanthella*» имеют эколого-биологический смысл и объединяют группу видов, часто далеких в систематическом отношении.

Существование любого организма, в том числе и водоросли, зависит от наличия в среде необходимых соединений, значений физических факторов, а также от диапазона толерантности (устойчивости) организма к изменениям отдельных факторов среды. Уровень, при котором конкретный фактор выступает в качестве лимитирующего, различен для разных групп и видов водорослей. В водных экосистемах к лимитирующим факторам относятся температура, прозрачность, наличие течения, содержание растворенного кислорода и биогенных элементов, значения рН, минерализация (соленость) и некоторые другие.

Характерной особенностью водной среды обитания, по сравнению с сухопутной, является большая сглаженность условий. Вследствие этого среди водорослей значителен процент эвритопных форм – космополитов, известны также убиквисты. Стенотопные формы (эндемики) водорослей встречаются достаточно редко и характерны, главным образом, для озер (Байкал, Севан, Иссык-Куль, Виктория).

По отношению к солености воды большинство водорослей являются стеногалинными видами, способными обитать исключительно в условиях низкого (пресноводные) либо высокого (морские) содержания минеральных соединений. Эвригалинных видов, способных обитать в широком диапазоне солености, среди водорослей немного.

В наземных условиях обитания качественные характеристики света достаточно постоянны, так же как и интенсивность фотосинтеза. Иные условия освещения для фотосинтетиков существуют в водной среде. Большая часть световой энергии поглощается в поверхностном (30–40 см) слое воды. Излучения синей и красной части спектра полностью поглощаются до глубины 5 м, ниже 10 м проникает только зеленая часть спектра. Необходимо учитывать также, что длина светового дня для водных организмов значительно короче за счет того, что в утренние и вечерние часы солнечные лучи скользят по поверхности воды (особенно это касается средних широт). Таким образом, распределение водорослей в толще воды в значительной степени определяется наличием света, необходимого для фотосинтеза. При этом у представителей

разных систематических групп в зависимости от состава пигментов-фоторецепторов фотосинтез происходит при разной длине световых волн.

В природных водоемах (континентальные воды, мировой океан) температура воды колеблется в относительно небольшом интервале ($+4 - +30^{\circ}\text{C}$), что обеспечивает оптимальные условия существования для подавляющего большинства видов водорослей. Вместе с тем, среди водорослей известны стенотермные формы, способные существовать в экстремальных температурных условиях: криофилы – при температуре около 0°C и ниже (на поверхности снега и льда) и термофилы – при температурах до $+50 - +95^{\circ}\text{C}$ (горячие источники и гейзеры).

Пути распространения водорослей разнообразны и в достаточной степени обеспечивают широкое их расселение. Основным фактором распространения водорослей является текучая вода – морские течения, реки. Важную роль играют также водоплавающие птицы, способствующие распространению клеток, талломов и диаспор водорослей на значительные расстояния во время суточных и сезонных миграций. При пересыхании водоемов вместе с илом и пылью диаспоры водорослей переносятся ветром; с мест водопооя водоросли разносятся животными с частицами ила.

Значение водорослей в природе. Водорослям, обитающим в воде, принадлежит основной вклад в общую продукцию органического углерода на Земле, поскольку $\sim 80\%$ поверхности планеты покрыта водой (Мировой океан, континентальные водоемы). По расчетам разных авторов вклад водорослей в общую продукцию органического углерода на Земле составляет от 26 до 90 %. Кроме того, в отличие от высших наземных растений у водорослей значительно выше КПД фотосинтеза (часть поглощенной солнечной энергии непосредственно реализованной в первичное органическое вещество).

Водорослям принадлежит ведущая роль в общем балансе кислорода на Земле. Вклад наземной растительности не дает долгосрочной чистой прибыли глобального баланса кислорода, поскольку кислород, выделяемый в процессе фотосинтеза наземными растениями практически в том же количестве

расходуется микроорганизмами на разложение растительного опада. В водоемах же разложение отмерших организмов происходит, главным образом, на дне, в анаэробных условиях. Главным регулятором баланса кислорода в атмосфере является океан. В верхних слоях воды, принимающих активное участие в газообмене с атмосферой, содержание растворенного в воде кислорода может превышать таковое в воздухе в 2–3 раза.

Массовое развитие водорослей в прежние геологические эпохи привело к образованию толщ осадочных пород:

- строматолиты (постройки колоний древних *Cyanophyta*);
- харациты (сложенные практически целиком из оогониев *Chara*);
- мела (кокколиты *Chrysophyta*);
- диатомит, кизельгур, трепел (состоящие из панцирей *Bacillariophyta* и отличающиеся соотношением органической и минеральной частей);
- барьерные рифы (с участием *Rhodophyta*, *Chlorophyta*, *Cyanophyta*).

Водоросли являются исходным материалом при формировании жидких и твердых нефтеподобных соединений – сапропелей, горючих сланцев, угля, возможно также нефти. Предполагается, что сапропель является предшественником нефти и горючих сланцев. Геологическая деятельность водорослей продолжается.

Водоросли – это активные агенты самоочищения⁹ природных вод, что определяется рядом особенностей. Обогащение воды кислородом, выделяемым водорослями при фотосинтезе (фотосинтетическая аэрация), значительно ускоряет процессы минерализации и детоксикации загрязняющих веществ. Как миксотрофы водоросли непосредственно извлекают из воды сложные органические соединения. И, наконец, экзометаболиты водорослей обладают бактерицидным действием по отношению к бактериям группы кишечной палочки.

⁹ Самоочищение – совокупность физических, химических и биологических процессов, в результате которых водоем освобождается от поступающих загрязнений.

1.5. Методика изучения водорослей¹⁰

Подготовка к сбору материала. Методические приемы по сбору водорослей в природе достаточно просты и чаще всего требуют не сложного оборудования, а внимания исследователя к деталям и тщательности в обследовании всех возможных местообитаний. Кроме того, работа по сбору материала из природных популяций определяется целью исследования. В этом смысле водоросли могут быть объектом и фундаментальных, и прикладных работ:

- составляющая общего биоразнообразия;
- база продуктивности водных экосистем;
- индикаторы состояния водных объектов в системе экологического мониторинга;
- объект в системе поиска и введения в культуру новых перспективных видов либо новых аборигенных штаммов.

Каждое из направлений требует предварительной подготовки и выбора соответствующих методов. Прежде всего, необходимо изучить экологию группы, представители которой интересуют исследователя. Общую экологическую характеристику можно найти в соответствующих определителях, где, помимо общих методов сбора и изучения, обычно указываются специальные методики работы с конкретной систематической группой водорослей.

Предварительная подготовка по литературным источникам необходима, но она не должна жестко ограничивать работу в полевых условиях. Водоросли весьма пластичны и при наличии соответствующих условий легко осваивают новые местообитания.

Лучшие результаты дает свободный поиск, в ходе которого могут быть сделаны неожиданные находки. Во время экскурсии следует обращать внимание не только на постоянные (реки, ручьи, каналы, озера, пруды, водохранилища), но и на различного рода эфемерные водоемы, где вода бывает перио-

¹⁰ Раздел составлен на основе методических приемов и методов, традиционных для харьковской альгологической школы В. М. Арнольди, передаваемых от учителя к ученикам и наиболее детально разработанных и полно изложенных в работах А. А. Коршикова и его ученицы А. М. Матвиенко.

дически (лужи, ямы, дренажные и придорожные канавы), а также искусственные емкости, с большей или меньшей периодичностью заполняемые водой (бассейны, ванны, бочки для сбора дождевой воды, корыта, лотки для водопоя животных или отвода воды и т. п.).

В сезонном отношении материал можно собирать круглогодично, в том числе и зимой. Определенное число видов из разных групп (*Chrysophyta*, *Cryptophyta*, *Bacillariophyta*, *Chlorophyta*) предпочитают более низкие температуры, чаще встречаются с поздней осени до ранней весны и, развиваясь в массовом количестве, способны вызывать зимнее подледное «цветение» воды.

Для успешной работы во время экскурсии нужно иметь при себе следующие необходимые материалы:

- посуда для проб (широкогорлые бесцветные прозрачные склянки, объемом 100–250 мл, широкие низкие пробирки; можно использовать пластиковые емкости, но только на время транспортировки проб в лабораторию);

- несколько бутылок (1,0–2,0 л) для запаса воды из водоемов;

- фиксирующие реактивы (формалин или водный раствор Люголя – I₂ в KI);

- термометр для измерения температуры воды; индикаторный набор для измерения pH воды в полевых условиях¹¹;

- планктонная сетка;

- небольшой сачок из марли или капрона (можно использовать готовые ситечка, но тогда необходимо иметь лоскуты соответствующих материалов для покрытия внутренней поверхности);

- черпак с раздвигающейся рукояткой для отбора проб на расстоянии 1,5–2 м от берега водоема;

- нож (нескладной, с плавающей рукояткой);

- лупа (×10);

- пинцеты разных размеров;

¹¹ Можно использовать соответствующие портативные устройства для параллельного измерения температуры, pH, электропроводности (косвенный показатель минерализации), окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) воды, а также содержания растворенного кислорода. Данные о электропроводности и ОВП могут быть учтены при выборе питательных сред.

- кисточка средней жесткости;
- ложка с заточенным краем;
- пипетка на 50–100 мл с накопителем;
- резиновая груша;
- грабельки для сбора нитчатых водорослей;
- запас бумажных пакетов;
- небольшая емкость (пластмассовая мисочка) для «прополаскивания» нитчаток, сфагнума и других субстратов при сборе форм обрастаний.

Посуда и инструменты должны быть чистыми и стерильными, без запаха формалина.

Следует предусмотреть полевой дневник для ведения записей. Для каждой пробы указывают время отбора, особенности места отбора (можно с указанием координат, определенных по GPS, для последующего нанесения на карту), погодные условия, метод отбора, любые другие детали, которые по мнению исследователя могут оказать влияние на качественный состав и количественное развитие водорослей (табл. 3). В полевых условиях все записи следует делать простым грифельным карандашом (м), что предохраняет текст на случай дождя или случайного попадания влаги.

Экскурсионная сумка должна быть с твердым дном и плотными стенками; лучше черного цвета.

Отбор проб из различных местообитаний. Пробы планктона отбирают простым зачерпыванием воды в бутылки или фильтрацией через планктонную сеть 50–100 л. Метод мембранной фильтрации нежелателен, т. к. дает большие потери:

- за счет разрушения нежных форм в условиях перепада давления на фильтре;
- за счет плотного прикрепления части видов к мембране.

При отборе пробы при достаточной глубине руку погружают в воду до середины локтя (15–25 см). В текучих водоемах пробы отбирают против течения. В стоячих или водоемах замедленного стока емкость для отбора пробы направляют горлом от себя, медленно продвигаясь вперед вдоль береговой линии.

Таблица 3

Дата « ____ » _____ 20 ____ г. Коллектор _____

Водоем: тип, название (топоним) _____

Расположение (область, район, ближайший населенный пункт) _____

температура воздуха _____ воды _____ pH _____
 электропроводность _____ мСм ОВП _____ мВ
 растворенный кислород _____ мг/л % насыщ. _____
 скорость и направление ветра: _____
 солнечное сияние: ☉⁰ ☉¹ ☉² облачность (в баллах) _____

Проба № _____ (индекс)

Тип пробы:

фитопланктон: ☐ – сетяной☐ – отстойный☐ – микрофитобентос, субстрат _____☐ – перифитон, субстрат _____Фиксация: ☐ – нет ☐ – да: _____ (раствор)

Расположение точки отбора (на схеме водоема) _____

GPS-координаты: _____

Характер берега: _____

Характер грунта: _____

Водная и прибрежная растительность: _____

Схема водоема

Особые отметки

(органолептические характеристики, наличие и форма хозяйственного использования)

В прибрежной зоне, в зарослях макрофитов или в скоплениях нитчатых водорослей также можно использовать планктонную сеть. Если же она часто забивается, то можно просто брать руками нитчатки и быстро собирать стекающую воду в любую емкость либо процеживать через сетку. В случае наполнения конуса сети, для ускорения фильтрации воды можно слегка (!) легкими движениями похлопывать открытой ладонью сбоку. Сжимать сетку категорически не следует. После каждого отбора планктонную сетку следует тщательно прополоскать.

Скопления нитчаток, куртины мхов и т. п. можно «прополаскивать» в небольшом количестве воды в любой удобной емкости; затем их слегка отжимают и удаляют (лучше вернуть туда же, откуда были взяты), а воду из емкости переливают в склянку через ситечко и слой марли с целью удаления крупных минеральных и органических частиц (сестона) и животных. Можно также встряхивать в склянке с водой кусочки высших водных растений.

Зеленую пену на поверхности водоемов собирают широкогорлой склянкой и специальным черпаком на раздвигающейся рукоятке. По возможности следует брать больше материала, минимум 100–200 мл – тогда легче найти редкие формы.

Собирая материал в мелких и заиленных лужах, следует использовать небольшие баночки, лучше всего широкие и короткие пробирки. При наличии слоя воды, ее зачерпывают широкогорлой склянкой, стараясь, чтобы ила в пробе было как можно меньше; если воды мало, ее можно собрать в банку ложкой или осторожно, не допуская значительной примеси донного осадка, отсосать через пипетку с накопителем и перелить в склянку.

Пробы микрофитобентоса собирают, осторожно снимая (не копать!) верхний слой донного осадка ложкой с заточенной боковой стороной. Соотношение грунта и воды в склянке должно составлять 1:10. В случае фиксации такие пробы требуют большего объема фиксирующего реактива.

Часто в пробах бывает много ракообразных и других беспозвоночных, которые за короткое время могут полностью уничтожить водоросли. В таких случаях воду фильтруют че-

рез марлю или любую другую сетчатую ткань (капроновый чулок), чтобы задержать хотя бы крупных рачков. Личиночные стадии проскакивают, и это следует иметь в виду, если материал желательно как можно дольше сохранять живым.

Если материал необходимо сохранить для лабораторного исследования, склянки (прозрачные, бесцветные) наполняют не доверху, оставляя определенный объем воздуха для обеспечения нормального газообмена в живой пробе (минимум 1,0–1,5 см под пробкой). Между пробкой и шейкой склянки можно вложить травинку, чтобы не создавать давления воздуха на пробку. Необходимо позаботиться, чтобы склянки чрезмерно не нагревались, не держать экскурсионную сумку на солнечном свете, не класть склянки в карманы брюк и т. д.

Помимо водоемов, в ходе экскурсии следует обращать внимание на пленки и корочки различного цвета на разных субстратах: почва, стволы деревьев, камни, стены и крыши домов, опоры мостов, откосы каналов и т. п. Здесь, среди мхов и лишайников, развиваются водоросли аэрофитона. Сбор материала по аэрофитону лучше проводить после дождя или в периоды с повышенной влажностью, когда разрастания водорослей видны на любом субстрате.

В зависимости от формы разрастания и субстрата отбор проб можно производить разными способами, одновременно внимательно просматривая материал под лупой:

- сухие корочки можно осторожно снимать пинцетом и временно помещать в бумажные пакеты;
- можно срезать небольшие участки коры деревьев или скабливать разрастания водорослей с их поверхности;
- на каменистых субстратах налеты можно предварительно слегка смачивать дистиллированной водой, а затем отсасывать через стеклянную трубочку или смывать с вертикальных поверхностей кисточкой;
- обнаруживая при осмотре через лупу деструктивные пятна на различных поверхностях (бетонные стены жилых и промышленных построек, заборы, памятники, парапеты и т. п.) следует осторожно сделать соскобы в бумажные пакеты.

Весь собранный материал сразу же после отбора необходимо этикетировать. Можно использовать широкий лейкопла-

стырь, малярный скотч и т. п. материалы, на которые наносят необходимые сведения или № пробы; все данные обязательно дублируются в полевом дневнике.

Изучение собранного материала. Качественно проведенное исследование водорослей в природе предусматривает обязательный параллельный сбор и анализ как живых, так и фиксированных проб. В фиксированных пробах в качестве своеобразного банка сохраняется все разнообразие видов в момент отбора пробы, что позволяет без спешки полностью обработать собранный материал, выявить редкие виды и при необходимости вернуться к водному объекту, из которого отобрана проба, и собрать новый материал. Следует, однако, помнить, что фиксирующие растворы вызывают деформацию клеток некоторых видов с нежными клеточными покровами, изменение морфологии клеток. Поэтому процесс фиксации следует проводить осторожно, в щадящем режиме, не допуская передозировки.

Первичный просмотр материала необходимо проводить в день сбора, чтобы сориентироваться в качественном составе пробы до того, как изменение условий повлияет на развитие организмов, часто чрезвычайно чувствительных к этому. Ночью может произойти копуляция или образование гамет, вегетативное размножение, пальмеллизация и т. п., что может в значительной степени изменить картину заселения и затруднить дальнейшую работу.

Кроме того, предварительный просмотр материала позволяет наметить план дальнейшей работы: выбрать пробы, требующие первоочередного обследования, что-то зафиксировать, а что-то при необходимости выделить в чистую культуру.

Пробы планктона для удобства работы с ними можно сгустить, отцентрифугировав их при небольшом числе оборотов центрифуги (1–3 тыс. об./мин, 5–10 мин). Идеальным вариантом является использование ручной центрифуги, особенно в случае работы с видами, лишенными жестких целлюлозных оболочек. Ручную центрифугу можно использовать в полевых условиях непосредственно после отбора проб. Разные виды водорослей обладают разной степенью устойчивости к цен-

трифугированию, и параметры центрифугирования нужно определять эмпирически. Неумелое центрифугирование может привести к сбрасыванию жгутиков монадными формами, распаду колоний, разрушению нежных клеточных покровов. Виды, имеющие эджективные органеллы, не переносят центрифугирования вообще. После центрифугирования осадок клеток ресуспендируют в небольшом объеме воды, осторожно встряхивая центрифужные пробирки, и переливают в склянки для сбора проб.

Принесенные с экскурсии склянки необходимо поместить на рассеянный свет (на северное окно) и открыть. Если организмов в склянке немного – можно их там и оставить. В противном случае материал пробы можно подрастить, используя элементы техники культивирования водорослей, которая более подробно будет рассмотрена в следующем разделе.

Относительно техники определения видов метод культивирования не имеет особого значения, и пользоваться им приходится главным образом лишь для того, чтобы сохранить материал в случае невозможности изучить его немедленно. Следовательно, в данном разделе можно ограничиться только общими сведениями по этому вопросу.

Рецептов для изготовления жидких сред для культивирования водорослей очень много. Из них самые удобные и, по опыту авторов, дающие чаще всего удовлетворительные результаты для решения задачи подращивания и сохранения живых проб, – это смеси Кольквитца (Kolkwitz) и Элманна (Ölmann).

Смесь Элманна не содержит солей Са, немного кислее (рН 6,4) и рекомендуется для культивирования водорослей кислых дистрофных водоемов. В ней хорошо развивается и большое число других организмов.

Для приготовления питательных смесей берут реактивы класса очистки «ХЧ». Удобнее готовить запас питательных смесей, растирая и тщательно перемешивая указанные соли и сохраняя их в хорошо закрытых склянках. Используют их в виде 0,010–0,020 % раствора в дистиллированной или чистой дождевой воде. Дистиллировать воду нужно со стеклянным холодильником.

К питательному раствору следует добавить 0,003 г/л FeCl_3 . Активная реакция (рН) должна быть 6–7. Регулируют ее, добавляя к раствору эмпирически установленное количество слабого раствора соляной кислоты и едкого кали (для подщелачивания). Иногда полезна более кислая реакция, т. к. в ходе развития водоросли могут подщелачивать среду.

Твердые среды готовят, добавляя к питательному раствору 1,5–2 % агара. Нередко изолированные организмы развиваются на них значительно лучше, чем на жидких средах. Особенности приготовления твердых сред см. в разделе 2.

Хорошая питательная среда для поддержания живых проб водорослей получается из простого настаивания почвы с равным по весу количеством дождевой или дистиллированной воды.

Для подрачивания пробы воды из склянки в день сбора следует перелить в 3 кристаллизатора (8–10 см в диаметре):

- в первом пробу оставить в натуральном виде;
- во второй добавить свежей воды (дождевой, дистиллированной, хуже – отстоянной водопроводной);
- в третий добавить питательный раствор (лучше всего Ölmann или Kolkwitz).

Если видовой состав собранного материала богат, такой метод часто дает хорошие результаты. Все емкости **обязательно!** закрывают пластинами стекла (чтобы избежать случайного заноса посторонних видов) и размещают перед окном так, чтобы по возможности не передвигать их до конца наблюдений. Не допускать попадания прямого солнечного света!

Пробы, помещенные на окно, начинают изучать не ранее, чем через 0,5–1 час. Уже через 20–30 минут фототаксичные зеленые формы собираются сверху на освещенной стороне сосуда и вследствие такой концентрации можно легко находить виды, представленные в пробе даже единичными экземплярами.

Полезно проводить наблюдения в ночные часы. Именно в ночные часы часто удается наблюдать образование и выход зооспор, их прорастание, образование и копуляцию гамет, деление клеток и пальмеллизацию.

Нередко, в связи с разной реакцией на свет и кислород, наблюдается дифференцированное размножение видов в сосуде,

поэтому для изготовления препаратов полезно брать материал из 4 мест: со дна и с поверхности на противоположных – освещенной и неосвещенной – сторонах. Кроме того, очень удобно готовить препараты, отбирая материал непосредственно покровным стеклом. Для этого его зажимают противоположными краями в пинцет, осторожно прикладывают к поверхности воды, снимают, стряхивают лишнюю воду и накладывают на предметное стекло. Если предполагается длительное наблюдение за этим препаратом, покровные стекла специальным шпателем припаивают к предметному стеклу парафином во избежание высыхания. В таких аккуратно сделанных препаратах водоросли сохраняются в нормальном состоянии иногда очень долго; необходимо только позаботиться о соответствующем освещении. Замечено, что в условиях таких препаратов исчезают запасные продукты и четко проявляется строение хлоропласта.

Эффективным методом изучения подвижных водорослей является метод висячей капли. На покровное стекло пипеткой наносят маленькую каплю, размазывая ее так, чтобы она не слишком свисала вниз (хорошо удается только с чистыми стеклами), переворачивают стекло и накладывают на предметное стекло с лункой.

Правильно сделанная висячая капля не должна стекать даже при медленном переворачивании и не должна касаться дна лунки. Для длительных наблюдений покровное стекло приклеивают к предметному, подпуская под него немного воды, а проще и надежнее – слюны, набранной на кончик пальца.

При одностороннем освещении в висячей капле, как и в сосудах-кристаллизаторах, водоросли собираются на освещенной и частично на противоположной стороне, что позволяет выявить все имеющиеся виды, вне зависимости от числа особей и их размеров. В случае необходимости можно, не вынимая препарат из-под микроскопа, зафиксировать объекты осмиевой кислотой или обработать йодом, уксусной кислотой, для чего под покровное стекло подпускают раствор соответствующего реактива, пары которого быстро достигают висячей капли.

Висячих каплях наблюдения за живыми объектами можно проводить очень долго (до 2–3 недель), если препараты заклеить по краю покровного стекла парафином или минеральным (парафиновым) маслом. Обычно для этих целей рекомендуют вазелин, но с ним работать не так удобно.

При изучении стадий развития форм эпифитных водорослей можно использовать ряд специальных методик:

- аппликации – покровные стекла приклеивают парафином к плоской стенке банки, в которую затем наливают пробу;
- поплавки – покровные стекла вонзают в пробку из пробкового дерева и оставляют плавать на поверхности воды в кристаллизаторе с пробой;
- подвески – покровные стекла подвешивают, приклеив на нитку парафином, на разной глубине в толще пробы.

При «старении» живых проб и препаратов можно наблюдать формирование стадий покоя, а при необходимости длительного сохранения пробы проводить пересев живого материала с использованием питательных смесей.

Наряду с вышеописанными методами обычный метод приготовления препаратов сохраняет свое значение. Если желательно вначале зафиксировать организмы, чтобы остановить их движение, действуют парами осмиевой кислоты или, если ее нет, йода (что дает худшие результаты), держа каплю с организмами на предметном или покровном стекле над склянкой с этими веществами. Осмиевую кислоту используют в виде 1–2 % раствора в дистиллированной воде, фиксация длится 5–10 секунд. Фиксация йодом в виде концентрированного раствора вместе с KI длится дольше. Спиртовой раствор Люголя использовать не следует. Лучшие результаты дает фиксация парами металлического йода (не дольше 1 секунды).

Для изучения диатомовых водорослей каплю пробы помещают на покровное стекло, которое прокалывают над пламенем горелки для полного удаления органики. Полученные сухие препараты, в которых сохраняются только панцири диатомовых, приклеивают парафином к предметному стеклу и этикетировать. На таких препаратах можно рассматривать детали строения панциря диатомовых водорослей, что часто

необходимо для их видовой идентификации. Сухие препараты можно хранить.

При наличии других представителей с панцирями (*Chrysophyta*, *Dinophyta*) каплю материала можно прокалить на пластинке слюды, используя пинцет Карне.

Анализ каждой природной пробы можно считать исчерпывающим, если он был проведен всеми возможными методами, включая длительное изучение живых проб, до того момента, когда в пробе перестали выявляться виды, не обнаруженные при предыдущих просмотрах.

В ходе работы не следует забывать о ведении протоколов обработки каждой пробы с указанием способа обработки и фиксации (зарисовка, фотографирование, детальное описание) всех состояний и стадий развития, которые удастся наблюдать.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ АЛЬГОЛОГИЯ

Преимущества водорослей как объекта экспериментальных исследований

В настоящее время водоросли широко культивируют в научных и производственных лабораториях различного профиля. Это обусловлено рядом особенностей водорослей, которые делают их удобным объектом экспериментальных исследований.

Водоросли *легко культивируются* по сравнению с другими объектами. Культура может поддерживаться в лаборатории в стеклянных колбах на жидких питательных средах, достаточно лишь обеспечить освещение. *Среды* имеют *простой минеральный состав*, в них редко вводят органические соединения и биологически активные вещества, абсолютно необходимые для культивирования клеток животных и клеток и тканей растений. В связи с этим монокультуру водорослей длительно удается поддерживать в условиях так называемой «относительной стерильности»: для предотвращения контаминации культуры другими видами водорослей, водными грибами, зооцеленцами достаточно при приготовлении сред и пересеве культур использовать чистую посуду.

С водорослями достаточно *легко экспериментировать*. Радиоактивно меченые субстраты, ингибиторы и другие ве-

щества, действие которых исследуется, могут быть внесены в жидкую питательную среду в виде растворов, колбы с культурой помещены в различные условия освещения и температуры, подвергнуты действию любых других физических факторов. Через определенное время экспозиции микроводоросли легко отделить от культуральной жидкости центрифугированием и, если необходимо, ресуспендировать в чистой питательной среде. Если это сделать достаточно быстро и осторожно, культура сохраняет жизнеспособность. Вместе с тем в эксперименте водоросли могут служить *полноценной моделью* прокариотической (синезеленые водоросли) и эукариотической (остальные отделы) фотосинтезирующей клетки, что позволяет экстраполировать данные, полученные на водорослях, на другие объекты, например, высшие растения. Не случайно последовательность темновых реакций фотосинтеза (цикл Кальвина) была расшифрована на зеленой водоросли *Chlorella vulgaris*.

Водоросли являются *объектом эволюционной биохимии*. Будучи эволюционно древними организмами, обитающими в консервативной водной среде, водоросли сохранили в своем составе огромное разнообразие соединений, которые были утрачены в ходе последующей биохимической эволюции. Изучая метаболизм водорослей можно проследить этапы становления метаболических путей, которые являются общими для высших организмов и в классической биохимии рассматриваются как данность.

Водоросли являются *объектом биотехнологии*. Они характеризуются колоссальным биохимическим разнообразием и содержат большое количество соединений необычного состава (например, хлорсульфолипид золотистых водорослей), которые обладают биологической активностью или другими полезными свойствами (например, железирующие агенты красных и бурых водорослей). Архаичной чертой обмена веществ водорослей является его *высокая пластичность в зависимости от условий среды*. Изменяя условия культивирования можно направленно добиваться высокого выхода целевых продуктов. Так, в одной и той же культуре водорослей биомасса в зависимости от условий может иметь следующий состав: белки – 8–58 %, углеводы – 6–37 %, жиры – 4–85 %.

При подготовке настоящего издания предполагалось, что специалист, приступающий к работе по культивированию водорослей, знаком с основами работы в лаборатории (качественный и количественный анализ, стерилизация, подготовка растворов и посуды, работа с культурами микроорганизмов и т. д.) в объеме вузовских курсов для бакалавров. С учетом сказанного, авторы детально не рассматривают стандартные приемы и методы, останавливаясь только на моментах, которые необходимо учитывать при работе именно с водорослями.

Общая классификация подходов к ведению культуры водорослей

В зависимости *от масштаба* культивирования выделяют *лабораторные и промышленные (массовые) культуры* водорослей. В зависимости *от целей*, с которыми проводят культивирование водорослей, существуют *три подхода* к ведению культуры:

1. Природная культура – имеет целью моделирование в лаборатории или промышленных реакторах условий природных популяций водорослей. Используется для изучения морфологии и жизненного цикла водорослей в лаборатории, для воспроизведения в промышленных реакторах естественных особенностей продуктивности и биохимического состава водорослей. В качестве материала для культивирования используются природные изоляты водорослей, а условия культивирования максимально приближены к условиям естественных местообитаний водорослей. В идеале природная культура всегда должна высеваться из материала, только что изолированного из природы. Однако на практике это не всегда возможно. Утрата в ходе пересевов природной культуры признаков и свойств, характерных для природных популяций водорослей, либо появление в культуре морфо-физиологических особенностей, которые никогда не наблюдаются в природе, должны служить бесспорным основанием для замены культивируемого материала на свежий изолят.

2. Экстенсивная культура – как правило, имеет целью лишь поддержание водорослей в культуре. Если дополнительной целью является получение биомассы, увеличение ее

урожая достигается простым увеличением объема питательной среды и времени культивирования. Условия культивирования, как правило, отличаются от природных, что может со временем привести к значительным генетическим отличиям культивируемого материала от природных популяций водорослей вследствие отбора. В то же время, целенаправленной селекции и оптимизации всех условий культивирования не проводится, хотя значения отдельных факторов среды (освещенности, температуры, концентрации некоторых компонентов питательной среды) могут поддерживаться в оптимальном диапазоне.

3. Интенсивная культура – имеет целью выращивание максимального урожая биомассы в минимальные сроки и в минимальном объеме питательной среды. Как правило, это промышленная культура, либо лабораторная культура, на которой проводятся предварительные исследования с целью организации промышленного культивирования водорослей. Задача увеличения продуктивности культуры решается путем скрининга наиболее продуктивного материала для культивирования, его селекции и генетической модификации, а также оптимизации всего комплекса условий культивирования и постоянного поддержания оптимальных условий в культуре.

2.1. Методы лабораторного культивирования

К настоящему моменту накоплен значительный опыт ведения лабораторных культур водорослей, который отражен в ряде методических сборников. Опубликованные протоколы методик не следует воспринимать в качестве жесткой схемы. Понимая общие принципы методов, можно разрабатывать собственные новые эффективные методы ведения культур. Работы по приготовлению питательных сред и введению водорослей в культуру могут быть организованы на базе стандартного оборудования биохимической или микробиологической лаборатории.

2.1.1. Лабораторная посуда для выращивания водорослей

Для культивирования водорослей чаще всего используют конические колбы (колбы Эрленмейера) различного объема, пробирки, чашки Петри, кристаллизаторы, матрасики для культивирования клеток, планшеты и т. д. Используется любая стеклянная и пластиковая лабораторная посуда при условии, что она может быть достаточно плотно закрыта, чтобы предотвратить испарение питательной среды и попадание в культуру пыли из воздуха. Посуду для культивирования водорослей можно закрывать фольгой, ватно-марлевыми пробками, полиэтиленовой пленкой, стеклянными пластинами.

Посуду моют с использованием синтетических моющих средств или соды (NaHCO_3) в соответствии с теми же требованиями, которые предъявляются к подготовке посуды для биохимических анализов. Посуду замачивают в растворе моющего средства, избегая образования воздушных пузырей внутри, затем механически моют с помощью ерша и губки. Губка позволяет отмыть культивационные сосуды от осадка клеток на стенках. Можно использовать хромовую смесь – пересыщенный раствор бихромата калия в концентрированной серной кислоте. Следует помнить, что посуду надо тщательно отполаскивать проточной водой от остатков моющих средств и хромовой смеси, которые могут ингибировать рост культур. После проточной воды посуду несколько раз ополаскивают дистиллированной водой и сушат в сухожаровом шкафу. При необходимости посуду стерилизуют.

2.1.2. Питательные среды

Состав питательных сред. Основой для составления прописи питательной среды для природной культуры служат гидрохимические анализы воды из природного местообитания водорослей.

Для экстенсивного выращивания водорослей пользуются прописями питательных сред, приведенными в литературе. Эти среды существенно отличаются по составу от природных

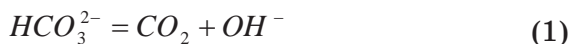
вод и не являются оптимизированными. Питательные среды можно (и нужно) модифицировать, но для успешного выращивания водорослей необходимо понимать, какую функцию выполняют в составе среды те или иные компоненты. Качественный состав модифицированной питательной среды должен отвечать потребностям водорослей во всех функциональных группах компонентов среды. При замене одного компонента другим новый компонент выбирают с той же степенью окисления элементов и вносят в эквимолярных или близких к ним количествах. Особенно это касается гидратов с отличным от прописи среды содержанием воды.

По функциональному значению компоненты питательных сред можно разделить на следующие группы:

1. Источники биогенных элементов.

- 1.1. Источники макроэлементов.

Источником углерода для клеток водорослей в природной и экстенсивной культуре служит раствор углекислого газа в среде, который находится в равновесии с углекислым газом атмосферы. При интенсивном культивировании водорослей питательную среду, как правило, барботируют углекислым газом. Обогащению среды источниками углерода способствует также внесение в среду гидрокарбоната натрия и органических веществ. Гидрокарбонат-ион в растворе находится в равновесии с растворенным углекислым газом.



Водоросли способны усваивать гидрокарбонат-ион благодаря наличию фермента карбоангидразы, катализирующей это равновесие, а также могут ассимилировать различные органические вещества (органические кислоты, аминокислоты, мочевины, сахара и др.). Аминокислоты и мочевина служат также источниками азота.

Азот и фосфор вносят в питательные среды чаще всего в форме солей натрия и калия – нитратов и фосфатов. Иногда источником азота могут быть соли аммония. Концентрации азота и фосфора в подавляющем большинстве прописей питательных сред, опубликованных в литературе, почти в 100 раз превы-

шают концентрации этих биогенов в природных водах. Для природных водоемов такие концентрации биогенов означали бы катастрофическую эвтрофикацию. Поэтому данные питательные среды нельзя применять для природной культуры.

Серу вносят в форме сульфата, чаще всего – сульфата магния $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

1.2. Источники микроэлементов.

В качестве микроэлементов в питательные среды вносят Fe, Mg, Mn, Zn, Cu, Ca, V, Mo, W, Co, Ni, B, Si. Потребность различных видов водорослей в микроэлементах отличается.

2. Осмотически активные вещества.

Осмотически активные соли NaCl и $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ вносят в питательные среды морских и гипергалобных водорослей в достаточно высоких концентрациях: от 29 до 116 г/л NaCl и от 12,5 до 50 г/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. В процессе роста культуры не происходит истощения этих солей. Они служат лишь для поддержания осмотического давления (солености) среды. Эти соли в питательных средах водорослей могут быть заменены простерилизованной морской водой или раствором морской садочной соли.

3. Буферные смеси.

Буферность питательным средам придают фосфаты натрия и калия. В зависимости от pH, которую необходимо поддерживать в среде, в нее вносят гидро- или дигидрофосфаты либо их смеси. Таким образом, фосфаты в составе питательных сред выполняют двойную функцию: источника фосфора и буферной системы.

4. Хелатирующие агенты.

Вносят в питательные среды, чтобы предотвратить гидролиз солей двухвалентных катионов микроэлементов. Особенно это касается солей железа. Хелатирующие агенты образуют комплексные соединения с ионами двухвалентных металлов и предотвращают образование их гидроксидов и переход в нерастворимую, недоступную для клеток водорослей форму. В растворе комплексные соединения находятся в равновесии с катионами и, по мере поглощения последних клетками, диссоциируют с образованием доступных для водорослей катионов. Комплексообразователи могут также предотвратить

токсическое действие ионов тяжелых металлов на водоросли. Поэтому комплексообразователи рекомендуют вносить в питательные среды, даже если они отсутствуют в прописи, в следующих случаях:

- если для приготовления среды использовались реактивы и вода, в степени очистки которых имеются сомнения;
- при культивировании олиготрофных видов;
- при низких исходных концентрациях клеток в культуре.

В качестве хелатирующих агентов в питательные среды вносят ЭДТА (этилендиаминтетрауксусную кислоту) или ее натриевую соль ($\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ или трилон-Б).

5. Органические вещества.

Вносят редко, с целью выявления сопутствующей бактериофлоры (глюкоза, сахароза, аминокислоты, мясной бульон) либо для изучения отдельных звеньев метаболизма водорослей.

6. Биологически активные вещества (витамины, регуляторы роста).

Вносят редко, при культивировании видов, *ауксотрофных* по отношению к определенным биологически активным веществам, то есть неспособных развиваться при их отсутствии.

7. Экстракты и отвары естественных субстратов (торфа, почвы, иловых отложений и др.).

Вносят для стимуляции развития в культуре водорослей специфических местообитаний (почвы, торфяных болот). Если выделяемый в культуру вид плохо растет на минеральной питательной среде, можно предположить, что его природное местообитание содержит какие-либо компоненты, необходимые для развития водорослей этого вида. Внесение в питательную среду экстрактов природных субстратов позволяет проверить это предположение.

8. Желирующий агент.

В качестве желирующего агента для приготовления твердых питательных сред чаще всего используют агар. Концентрация агара, необходимая для приготовления твердой среды, зависит от концентрации солей в питательной среде. Для большинства сред используют концентрацию 1 %. В достаточно разбавленные среды, такие как среда Прата, агар вносят в концентрации 1,5 %, в концентрированные среды (среда

Артари), агар вносят в концентрации 0,5 %. Концентрацию агара рекомендуют также понижать при культивировании подвижных водорослей, т.е. водорослей с монадной структурой морфологической дифференциации таллома.

Для приготовления твердых питательных сред можно также использовать гель на основе кремниевой кислоты (H_2SiO_3). Преимущества такого геля в том, что он не содержит органических веществ, на нем не развиваются бактерии и грибы. Авторы данного пособия готовят кремниевый гель по следующей прописи:

1) 1 г мелко растертого в ступке Na_2SiO_3 растворяют в 10 мл 0,5 н NaOH при кипячении. При необходимости после кипячения корректируют объем раствора, доводя его дистиллированной водой до 10 мл;

2) полученный раствор нейтрализуют равным объемом 2,5 н HCl и быстро переливают в чашку Петри для застывания;

3) после застывания геля (через 1–2 ч) на его поверхность осторожно приливают максимальный объем дистиллированной воды. Гель настаивают с водой в течение 3 суток, заменяя воду каждые сутки. Это делается, чтобы отмыть гель от NaCl, образовавшегося в результате взаимодействия HCl с NaOH и Na_2SiO_3 . Отмывку ведут до исчезновения качественной реакции на Cl^- с AgNO_3 ;

4) в течение 3 суток аналогичным образом, приливая на поверхность геля, настаивая и заменяя 1 раз в сутки, гель насыщают необходимой жидкой питательной средой. Жидкость с поверхности геля смывают, после чего он готов к посеву водорослей.

Правила приготовления и хранения питательных сред. Питательные среды готовят в мерных колбах для приготовления растворов. В основном, правила приготовления питательных сред соответствуют правилам приготовления растворов, концентрация которых выражена в граммах (миллиграммах) на литр. Концентрации отдельных компонентов могут быть выражены в процентах. Растворы этих компонентов готовят по правилам приготовления процентных растворов. В при-

готовлении питательных сред для водорослей существуют некоторые особенности.

1. Среды готовят, используя деионизированную, дистиллированную либо хотя бы отстоянную и прокипяченную водопроводную воду. Следует помнить, что при использовании деионизированной воды, а также дистиллята хорошего качества, вносить в среду раствор микроэлементов обязательно.

2. Реактивы используют максимальной доступной степени чистоты, минимум «ч» («чистый»).

3. Навески солей вносят в приготавливаемую среду строго в порядке прописи. К первой навеске приливают небольшой объем воды и перемешивают. Каждую последующую навеску вносят после полного растворения предыдущей, при необходимости добавляя небольшие порции дистиллированной воды.

4. Раствор солей железа вместе с хелатирующим агентом готовят и вносят в среду отдельно.

5. Любые трудно растворимые в питательной среде соли (по опыту) растворяют отдельно в небольших порциях воды и вносят в питательную среду в виде растворов, но также строго в порядке прописи.

6. Раствор микроэлементов готовят последним и вносят в среду отдельно.

7. После того, как в среду внесены все необходимые компоненты и произошло их полное растворение, объем доводят водой до метки, после чего среду фильтруют.

8. Для приготовления агаризованной среды в готовую жидкую среду вносят необходимую навеску агара и нагревают на кипящей водяной бане или на огне через рассекатель до полного растворения агара, о чем свидетельствует прозрачность раствора. Раствор горячим разливают в пробирки или чашки Петри. Чашки Петри помещают на горизонтальную поверхность, пробирки – под наклоном и оставляют до полного застывания агара.

9. Жидкие и твердые питательные среды можно хранить плотно закупоренными в холодильнике. Желательно, чтобы время хранения не превышало 1 месяца, так как при длительном хранении в средах начинают расти водные грибы, происходит испарение части воды, гидролиз, окисление и осаж-

дение компонентов среды. Стерилизация питательных сред предотвращает развитие водных грибов.

Если требуется периодически готовить одновременно несколько питательных сред, содержащих одинаковые компоненты в разных концентрациях, можно пойти по пути приготовления маточных растворов отдельных компонентов. В этом случае приготовление питательных сред заключается в смешивании необходимых объемов маточных растворов. Такой подход снижает затраты времени и труда (уменьшается количество навесок, которые необходимо сделать), а также способствует лучшей сохранности питательных сред, так как растворы индивидуальных компонентов менее подвержены заселению грибами и химическим преобразованиям.

Расчет концентрации маточных растворов проводится непосредственно для тех питательных сред, которые необходимо приготовить. При этом руководствуются следующими правилами:

1. Концентрацию компонента в маточном растворе выбирают произвольно. Она должна быть выше его концентрации во всех питательных средах, но ниже предела растворимости данной соли в воде при комнатной температуре. Концентрацию компонента в маточном растворе корректируют при расчете объема маточного раствора, необходимого для приготовления среды. Расчет удобно проводить в таблице.

| Компонент | Концентрация маточного раствора, г/л | Среды | | | | | | | |
|-----------|--------------------------------------|-------|------|-----|------|-----|------|-----|------|
| | | | | | | | | | |
| | | г/л | мл/л | г/л | мл/л | г/л | мл/л | г/л | мл/л |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |

2. Если объем маточного раствора для внесения в питательную среду слишком мал, и его трудно точно отмерить с помо-

пчью имеющегося в лаборатории оборудования, концентрацию соли в маточном растворе уменьшают.

3. Если объем слишком мал, допустимо проводить предварительное разбавление маточного раствора, а затем отмерять необходимый объем разбавленного раствора для внесения в питательную среду.

4. Если объем слишком велик и при суммировании объемов маточных растворов для приготовления 1 л среды их суммарный объем превышает 1 л, концентрацию компонента в маточном растворе увеличивают.

5. При приготовлении питательных сред часть компонентов может вноситься в виде навесок, часть – в виде маточных растворов.

6. Навески вносят и маточные растворы сливают в мерную колбу также строго в порядке прописи питательной среды.

7. В остальном поступают аналогично стандартному методу приготовления питательной среды.

Готовых прописей питательных сред для целей интенсивного культивирования водорослей не существует. Состав питательной среды должен быть оптимизирован с учетом остальных условий культивирования и особенностей данной конкретной культуры. Один из способов оптимизации состава питательной среды – определение выноса биогенных элементов с биомассой. В извлеченной из питательной среды биомассе определяют содержание биогенов и в соответствии с полученными данными компенсируют вынос биогенов увеличением их концентрации в питательной среде. Такие питательные среды называются сбалансированными.

2.1.3. Культуральный материал

Коллекции культур и штаммы. Сам объект культивирования – культуру водорослей можно взять у других исследователей либо выделить самостоятельно из природы.

Источником посевного материала для культивирования могут быть коллекции (банки) культур водорослей, предоставляющие этот материал на коммерческой основе или, как

правило, для исследовательских целей – бесплатно, либо на основе взаимобмена. Банки культур обычно организуются при научно-исследовательских учреждениях, кафедрах или лабораториях высших учебных заведений. Они могут публиковать собственные каталоги культур, иметь сайты в Интернет, быть зарегистрированными в международных базах данных коллекций культур, о них можно узнать по указаниям на происхождение исследуемого материала, которые делают авторы научных публикаций в разделе «Материалы и методы».

Указание на происхождение культурального материала является обязательным при любом обнародовании результатов исследования (публикации, докладе, составлении научного отчета). На крупные, достаточно известные коллекции культур ссылаются, указывая после вида водорослей так называемый акроним коллекции (ее сокращенное название латинскими буквами), например: IBASU – Institute of Botany of Academy of Science of Ukraine (Институт ботаники Академии наук Украины), IBSS – Institute of Biology of Southern Seas (Институт биологии Южных Морей), CWU-Mac – Chernyaev University Microalgae collection (Коллекция микроводорослей Гербария Черняева, т. е. Гербария Харьковского университета). После акронима коллекции указывается номер, под которым культура хранится в коллекции, – номер штамма. Номер штамма присваивается его автором, выделившим штамм исследователем, произвольно, как правило, он соответствует хронологическому порядку выделения данного штамма из природы.

Следует помнить, что не всякая культура является штаммом. Штаммом называют моновидовую культуру, достаточно хорошо изученную физиолого-биохимически. Физиолого-биохимическая характеристика должна быть отражена в паспорте штамма, который в обязательном порядке предоставляется вместе с самой культурой.

Паспорт штамма содержит информацию о его происхождении, дате и месте его выделения из природы, авторе, выделившем штамм, условиях его выращивания и составе питательной среды, морфологических и культуральных признаках. Разные коллекции придерживаются разных стандартов при

составлении паспорта штаммов, но все они стремятся предоставить как можно больше информации о каждом штамме. Ценность культур, предоставляемых коллекциями, заключается в их известных, хорошо документированных и стабильно воспроизводимых свойствах. Такие штаммы, как правило, выделены из природы несколько десятков лет назад.

Нередко частью паспорта штамма является библиография научных работ, проведенных на этих штаммах, которая может быть довольно обширной. Многие исследователи предпочитают работать с такими достаточно «старыми» и «популярными» штаммами, так как это дает возможность проводить сопоставления оригинальных данных с данными других авторов, что должно значительно повышать эффективность научного поиска.

До тех пор, пока не собран достаточный материал для составления паспорта штамма, выделенную из природы моновидовую культуру следует называть изолятом. Для целей ведения природной культуры изоляты, недавно выделенные из природы, являются предпочтительными.

Выделение природных изолятов водорослей

Отбор природных проб, устранение зооконтаминантов и подготовка к выделению культуры. Первым этапом выделения водорослей в культуру из природы является отбор проб. В зависимости от того, какой вид требуется ввести в культуру, отбор проб проводят в период массового развития данного вида и в соответствующем местообитании на основании данных предварительных альгофлористических исследований. Для макроводорослей большое значение уделяется фазе жизненного цикла, в которой проводится сбор материала, поскольку особую ценность представляет материал, несущий зрелые репродуктивные органы (спорангии, гаметангии), собранный до освобождения репродуктивных клеток (зооспор, апланоспор, зигот). Следует учитывать, что на прохождение фаз жизненного цикла водорослей могут оказывать влияние сезон, время суток и даже фаза Луны.

Метод отбора проб должен обеспечивать извлечение живого материала из природных местообитаний и доставку его в

лабораторию в жизнеспособном состоянии. Обычно пользуются теми же методами, что и при стандартном отборе проб при альгологических исследованиях, исключая фиксацию проб (см. раздел «Методика изучения водорослей»).

При выделении в культуру макроводорослей собирают фрагменты талломов, желательно молодые апикальные либо несущие репродуктивные органы, свободные от видимой контаминации эпифитами и беспозвоночными. Фрагменты талломов глубоководных макроводорослей сразу после сбора помещают в контейнеры, заполненные водой, отобранной с той же глубины, не подвергая их обсыханию и как можно меньше – колебаниям температуры. Фрагменты талломов, несущие органы размножения, собранные в прибойной зоне во время отлива, напротив, не следует помещать в воду, так как это вызовет немедленное освобождение репродуктивных клеток. Их заворачивают во влажную бумагу и помещают в пластиковые пакеты.

Параллельно с отбором альгологических проб из водоемов желательно отобрать образцы воды для гидрохимического анализа, а также достаточный объем природной воды, который на первых этапах введения водорослей в культуру послужит питательной средой.

При работе с пробами по возможности желательно избегать жестких химических или физических воздействий, которые могут привести к гибели водорослей или генетическим изменениям водорослевого материала – мутациям. Следует помнить, что чем короче время между отбором проб и выделением водорослей в культуру, тем выше сохранность, репрезентативность и жизнеспособность отобранного материала. Предварительные этапы работы с пробами по выделению культур можно начать сразу в поле либо отложить до доставки в лабораторию.

Температура во время транспортировки материала в лабораторию должна быть на 5–10 °C ниже, чем в естественной среде обитания водорослей. Особенно важно поддерживать пониженную температуру при транспортировке проб глубоководных макроводорослей. Для поддержания оптимальной температуры собранный материал можно перевозить в термо-

сах. Отобранные пробы допустимо хранить до 1 суток в холодильнике.

Пробы планктона для удобства работы с ними можно сгустить, используя классический для альгологических исследований метод с сифонной трубкой или отцентрифугировав их при небольшом числе оборотов центрифуги (1–3 тыс. об./мин, 5–10 мин).

В отличие от планктона, пробы бентоса, аэрофитона, почвы, крупные колонии водорослей для удобства дальнейшей работы измельчают и сортируют вручную. Водорослевый материал соскабливают с субстрата, осторожно гомогенизируют в стеклянном гомогенизаторе, пропускают через шприц. Задача – получить небольшие фрагменты жизнеспособного водорослевого материала.

Отобранный материал можно некоторое время поддерживать на питательной среде без выделения в чистую культуру. Первоочередная задача – избавиться от присутствия в пробах зоологических объектов (инфузорий, коловраток, мелких ракообразных и др.), которые могут выесть водоросли.

С целью удаления крупных представителей зоопланктона, пробы планктона сразу после отбора можно процедить через марлю или другой крупноячеистый материал.

Оптимальным способом решения задачи полного удаления зооконтаминантов, щадящим для водорослевого материала, является посев проб в лаборатории в чашки Петри на агаризованную питательную среду, приготовленную на простерилизованной природной воде. Полученные культуры помещают в условия слабого освещения (около 1 клк, либо на северное окно), чтобы избежать фотоингибирования клеток, еще не адаптированных к условиям в культуре.

Рост колоний водорослей, а также гибель зооконтаминантов, зафиксированных на поверхности среды и не способных добраться до пищи, можно контролировать под микроскопом, помещая открытые чашки Петри на предметный столик.

После того как поверхность агаризованной среды приобретет слегка зеленоватую окраску, на поверхность агара в чашку Петри приливают небольшой объем жидкой среды либо простерилизованной природной воды и смывают клетки во-

дорослей в колбу. При необходимости полученную суспензию клеток можно снова поместить на слабое освещение для того, чтобы нарастить больше материала в накопительной смешанной культуре. Для подавления развития сопутствующих организмов в среду могут быть добавлены диоксид германия, антибиотики, детергенты. Растущую смешанную культуру периодически микроскопируют. Следует помнить, что длительное выращивание в смешанной культуре, как на агаре при борьбе с зооконтаминантами, так и в жидкой суспензии после смыва с агара, неизбежно приведет к изменению соотношения видов в смешанной культуре. Это может затруднить выделение в чистую культуру видов-аддиторов, которые в природе встречаются единично, обладают низкой скоростью деления клеток, и не способны к массовому развитию.

Для удаления зоологических объектов из проб макроводорослей достаточно поверхностной очистки талломов. Поверхность талломов очищают от зооконтаминантов и эпифитов мягкой кисточкой под водой. Поверхностную очистку фрагментов талломов проводят также, протягивая их через толщу агаризованной среды в чашке Петри.

Если талломы несут репродуктивные органы, в лаборатории добиваются освобождения в среду репродуктивных клеток. Как правило, на этот процесс большое влияние оказывает температура и цикл свет-темнота. Для синхронного освобождения репродуктивных клеток фрагменты талломов выдерживают некоторое время в темноте при субоптимальной температуре, затем помещают на свет и слегка повышают температуру.

Если не удастся добиться синхронного освобождения репродуктивных клеток, можно оставить фрагмент таллома в среде на более длительное время, до тех пор, пока на дне и стенках сосуда из освобождающихся постепенно репродуктивных клеток не прорастут молодые талломы. Их можно затем пересадить пинцетом или пипеткой. Для данного подхода удобно приготовить препарат «висячая капля» с фрагментом материнского таллома в капле среды. Молодые талломы прорастают из репродуктивных клеток, прикрепившихся к покровному стеклу по краям капли. Стекло вместе с пророст-

ками промывают стерильной средой и помещают в сосуд для дальнейшего культивирования.

Выделение альгологически чистых культур. Альгологически чистой культурой называют моновидовую культуру водорослей, свободную от клеток других видов водорослей, а также от водных грибов, но содержащую сопутствующую бактериофлору. Известно, что бактериальный компонент культур водорослей обладает специфичным по отношению к виду водорослей видовым составом и состоит из нескольких (до десятка) видов бактерий. Это бактерии, которые сопутствуют водорослям в их естественных местообитаниях. По-видимому, за многие миллионы лет совместного существования между водорослями и бактериями сложились метаболические и сигнальные связи. В норме бактериальный компонент не угнетает рост культуры водорослей. Напротив, в отсутствие специфичного бактериального комплекса культура развивается плохо. У некоторых макроводорослей (например, *Enteromorpha*, *Porphyra*, *Monostroma*) нарушается морфология. По этой причине многие исследователи предпочитают работать именно с альгологически чистыми культурами. Кроме того, методы выделения альгологически чистых культур достаточно просты и не оказывают на клетки водорослей мутагенного действия.

Выделение альгологически чистых культур микроводорослей удобно проводить из смешанных культур, в которых концентрация клеток всех видов не превышает 100 клеток в 1 мл. Смешанную культуру можно предварительно разбавить чистой средой. Альгологически чистые культуры макроводорослей могут быть получены из суспензии репродуктивных клеток, либо из фрагментов талломов.

Методы выделения альгологически чистых культур микроводорослей, а также макроводорослей из суспензии репродуктивных клеток основаны на принципах пространственного разделения клеток, принадлежащих к разным видам, и создания селективных условий, способствующих преимущественному развитию клеток целевого вида.

Пространственное разделение клеток разных видов может осуществляться путем отлова единичных клеток или

групп клеток одного вида стеклянным микрокапилляром или микроманипулятором из капли жидкой среды на предметном стекле либо с поверхности или из толщи агаризованной среды под микроскопом. Исходная суспензия клеток должна быть предварительно хорошо разбавлена средой, чтобы клетки разных видов в ней находились достаточно далеко друг от друга. То же касается и инокулята, высеянного на агаризованную среду для последующего отбора колоний, образующихся на агаре в результате деления единичных клеток.

Можно проводить посев исходной суспензии клеток на агар штрихами (например, при помощи микробиологической петли). В этом случае, если в начале штрихов клетки могут располагаться очень близко друг к другу, в конце штрихов клетки, а впоследствии и образующиеся из них колонии, будут располагаться на расстоянии, удобном для их отбора.

Отобранные микрокапилляром клетки можно дополнительно промыть, последовательно перенося их из капли в каплю чистой среды на предметном стекле, либо из заполненной средой лунки в другую лунку планшеты.

Пространственного разделения клеток разных видов можно добиться путем многократного последовательного разведения смешанной культуры в небольших объемах чистой среды, пока в одной пробирке или ячейке планшеты теоретически не окажется единственная клетка.

Достаточно крупные нитчатые водоросли можно очистить от более мелких видов и эпифитов, взяв их пинцетом или микробиологической петлей и отполоскав в чистой питательной среде, либо протянув через толщу чистой агаризованной среды.

Для разделения эпифитов и водорослей, на которых они поселяются, а также для выделения водорослей-обрастателей их отделяют от субстрата механически, микрокапилляром или микробиологической петлей, либо обрабатывая смешанную культуру не повреждающим клетки ультразвуком (20–90 кГц, 10 сек. – 20 мин), иногда в присутствии детергентов (например, 5 % Tween 80).

Можно использовать способность некоторых видов водорослей адгезировать к поверхностям, слив суспензию клеток других видов, не прикрепившихся к стенкам, из колбы со сме-

шанной культурой, либо помещая на некоторое время в колбу стекла для обрастания. Водоросли могут быть отобраны с поверхности стекла обрастания микрокапилляром под микроскопом или стекло помещают на поверхность агаризованной среды для наращивания колоний и их последующего отбора.

Зиготы и апланоспоры макроводорослей могут адгезировать к стеклу в процессе выделения и промывки. Известно, что этому препятствуют экзометаболиты материнского таллома. Поэтому выделение и промывку неподвижных репродуктивных клеток рекомендуют проводить в простерилизованном культуральном фильтрате материнского таллома, в котором таллом из расчета 10 г на 50–100 мл воды был выдержан как минимум 1 час. После серии промывок репродуктивные клетки помещают в капли стерильной среды на покровных стеклах и дают им осесть. Заселенные таким образом стекла-субстраты помещают в емкости со средой для культивирования.

Если целевой вид существенно отличается размером и весом клеток от остальных, присутствующих в смешанной культуре, для его отделения можно использовать центрифугирование, отстаивание или фильтрацию. Если целевой вид крупнее, чем ячейка фильтра, фильтрацию осуществляют до тех пор, пока над фильтром не останется небольшой слой жидкости (т. е. не досуха). Эту жидкость переносят в новую емкость, разбавляют чистой средой и повторяют процедуру фильтрации через чистый фильтр.

Специфическое оборудование – цитометры – позволяет производить быструю автоматическую сортировку клеток по размерам или параметрам флуоресценции в отдельные ячейки планшеты, заполненные питательной средой.

Эффективный выбор селективных условий для преимущественного развития целевого вида требует знаний биологии вида. Примерами использования *селективных условий* могут служить:

- боковая подсветка капли при отлове капилляром клеток, обладающих положительным или отрицательным фототаксисом;
- высокая концентрация осмотически активных солей в среде при выделении гипергалобных видов водорослей;

- высокая температура культивирования при выделении термофильных и низкая – при выделении криофильных водорослей;
- внесение в среду солей кремния для выделения диатомовых водорослей и, напротив, диоксида германия – для подавления развития диатомовых;
- внесение солей аммония для выделения эвгленовых водорослей;
- обработка антибиотиком циклогексимидом (100 мг/л) – для подавления развития эукариот при выделении синезеленых водорослей.

Приведенный перечень приемов не является исчерпывающим. Любой исследователь может предложить собственные методы выделения альгологически чистых культур, основываясь на понимании принципов механического разделения и селективных условий и знании биологии своих целевых объектов.

Отобранные любым методом клетки переносят в небольшой объем чистой питательной среды в пробирке, которую затем выставляют на слабое освещение для выращивания. Выделение альгологически чистых культур необходимо проводить с большим числом повторностей (от 10 и больше). Это связано с тем, что высокая степень разбавления культуры (одна или несколько клеток во всем объеме среды) является стрессовой для водорослей, кроме всего, не каждая клетка может оказаться жизнеспособной, и часть изолированных клеток погибнет.

Альгологическую чистоту получаемых культур контролируют под микроскопом. На первых этапах может оказаться, что полученная культура обогащена экземплярами целевого вида, но все-таки не является альгологически чистой. Комбинируя и многократно повторяя различные методы, можно добиться альгологической чистоты культуры.

Среди всех методов выделения альгологически чистых культур метод отбора групп клеток с поверхности агаризованной среды дает уникальную возможность получения клоновых культур микроводорослей. Компактная группа клеток на поверхности агаризованной среды представляет собой ко-

лонию, образовавшуюся в результате деления единственной клетки. Клоновая культура – это культура, все клетки которой представляют собой потомство одной исходной клетки. Клоновые культуры считаются более генетически однородными, особенно если для данного вида не характерно половое размножение.

Не следует путать понятия штамм и клон. Некоторые штаммы могут иметь клоновое происхождение – это должно быть указано в паспорте штамма.

Процедуру выделения клонов с поверхности агаризованной среды рекомендуют провести с одной культурой 3–4 раза, чтобы снизить вероятность случайного попадания в одну группу клеток на агаре потомства нескольких клеток исходной культуры.

Клоновые культуры макроводорослей получают из фрагментов таллома. Работа с фрагментами талломов затруднена, поскольку кроме эпифитов талломы часто контаминированы эндофитами, которые поселяются в межклетниках, например, водными грибами. Поверхностной обработки талломов недостаточно, чтобы избавиться от эндофитов.

Для выделения в чистую культуру из частей таллома подходят виды водорослей, характеризующиеся выраженным апикальным ростом и быстрым делением клеток (например, *Sargassum*). Для таких водорослей существует вероятность того, что молодые части талломов обгонят в росте эпи- и эндофиты и будут свободными от них.

Методы выделения в чистую культуру макроводорослей из фрагментов талломов практически идентичны методам культуры тканей высших растений и отличаются только более мягкой обработкой материала. Это обусловлено тем, что в отличие от высших растений, талломы макроводорослей не имеют кутикулы.

Применяют химические и физические методы стерилизации. Фрагменты талломов опускают на 1–2 мин. в 70 % этанол, затем в стерильную воду, затем обрабатывают препаратом биглюконат хлоргексидин. Также используют антибиотики и фунгициды, ультрафиолет и ультразвук. Подбор параметров обработки осуществляют экспериментально.

После поверхностной очистки и стерилизации талломов нарезают небольшие кусочки – экспланты, захватывая апикальные и краевые зоны роста таллома, и помещают их на твердую питательную среду (все операции – в стерильных условиях). Через некоторое время по краю экспланта нарастает каллус, который можно пассировать (пересевать). Так, известно, что каллус *Porphyra* и *Sargassum* удается пассировать как минимум 2–4 года. Клетки каллуса довольно слабо связаны между собой. Каллус можно ресуспендировать в жидкой среде и получить культуру клеток. Такие культуры также можно достаточно длительно поддерживать при условии их постоянного перемешивания (на шейкере). В отсутствие перемешивания клетки быстро оседают и снова дают каллус. Из экспланта, каллуса, культуры клеток можно получить культуру протопластов, т. е. клеток, лишенных клеточной стенки. Этот процесс называется мацерация, осуществляется с помощью ферментов. Для высших растений – это целлюлазы и пектиназы, для водорослей набор ферментов иной (например, агаразы). Источник ферментов – животные, которые питаются водорослями (улитки, морские ежи), грибы, бактерии. Протопласты используют для трансформации и соматической гибридизации водорослей. При дальнейшем культивировании они довольно быстро регенерируют клеточные стенки. Культура тканей, эксплант, культура клеток могут давать регенеранты – молодые талломы, свободные от сопутствующих организмов.

У макроводорослей с неклеточным многоядерным талломом можно индуцировать образование протопластов в качестве раневой реакции. Таллом помещают в стерильную среду, отрезают его часть или делают тонкой иглой отверстия в клеточной стенке. Образовавшиеся через несколько часов протопласты суспендируют, перемешивая среду, в которую помещен поврежденный таллом, и переносят микропипеткой в отдельные емкости. Индивидуальные протопласты регенерируют клеточную стенку и дают начало регенерантам.

Выделение бактериологически чистых культур. Бактериологически чистыми, стерильными или аксеничными культурами называют моновидовые культуры водорослей, в которых отсутствует бактериальный компонент. Несмотря

на все недостатки (медленный рост, нарушения морфологии, вероятность возникновения мутаций в процессе выделения культуры) такие культуры являются предпочтительными для исследования в том случае, если присутствие бактериального компонента может затруднить интерпретацию результатов экспериментов.

Выделение бактериологически чистых культур удобно проводить из уже альгологически чистой культуры. Бактериологически чистые культуры макроводорослей получают из репродуктивных клеток.

Методы выделения бактериологически чистых культур можно разделить на несколько групп: пространственное разделение, химическая очистка, физические методы.

Методы *пространственного разделения* по сути воспроизводят методы выделения альгологически чистых культур. Если путем пространственного разделения удастся получить одиночные клетки водорослей, теоретически можно получить и одиночные клетки водорослей, изолированные от клеток бактерий. Например, для отделения клеток водорослей от клеток бактерий можно использовать фильтрацию через мембранные фильтры с диаметром пор 0,2 мкм.

Отличие методов выделения бактериологически чистых культур состоит в том, что на всех этапах необходимо вести контроль путем отсева части культуры на контрольные среды, жидкие или агаризованные, с органическими источниками углерода, способствующими развитию и выявлению бактерий. При работе с культурами, выделенными из мезо- и полисапробных местообитаний, используют достаточно высокие концентрации органики (0,5–1 % глюкоза, 0,25 % мясной бульон, 1–2 % сусло, 0,1 % пептон и др.). При работе с культурами из олигосапробных местообитаний берут значительно меньшие концентрации органики (например, 18 мг/л глюкозы, 15 мг/л пептона), так как высокие концентрации органики способны вызвать гибель бактерий-олигосапробов. Большинство морских бактерий могут быть выявлены на средах, которые дополнительно содержат метиламин гидрохлорид ($1,6 \times 10^{-2}$ М) – продукт разложения осмотически активных веществ морских водорослей.

Культуры, в которых присутствуют бактерии, будут вызывать помутнение контрольных сред. Как только удастся выделить бактериологически чистую культуру, контрольная среда останется прозрачной.

Еще один метод проверки бактериальной чистоты культуры – окрашивание флуоресцентными красителями (ДАФИ – диамино фенилиндол) для выявления бактерий, прикрепившихся к поверхности клеток водорослей.

Химические методы очистки состоят в добавлении в питательную среду химических агентов, вызывающих гибель бактерий. Часто добавляют и фунгицидные препараты. Действие стерилизующих агентов на водоросли должно быть кратковременным, после чего их отмывают стерильной средой. Культуру микроводорослей несколько раз центрифугируют, ресуспендируя осадок в чистой стерильной среде. После отмывки водоросли высевают на стерильную питательную среду.

В качестве бактерицидных агентов используют стерилизующие агенты – антисептики (этиловый спирт, фенол, риванол, перекись водорода и т. д.), иногда – сульфаниламидные препараты. Можно использовать природные антисептики – сок ягод клюквы и брусники, содержащих бензойную кислоту. Антибиотики можно применять по отдельности, в сочетаниях и последовательно. Современная химико-фармацевтическая промышленность предлагает очень широкий спектр антибиотиков. Чувствительность к ним различных микроорганизмов различна. Для выделения бактериологически чистых культур необходимо подобрать такие препараты, их сочетания, концентрации и время экспозиции, чтобы водоросли оставались жизнеспособными, а бактерии – погибали.

В литературе приводится ряд рекомендаций для подбора антибиотиков:

1. Необходимо сочетать антибиотики, действующие на грамположительные бактерии (например, пенициллин), с антибиотиками, действующими на грам-отрицательные бактерии (например, стрептомицин).

2. При использовании антибиотиков, ингибирующих синтез клеточных стенок бактерий (пенициллин, цефалоспорин), в среду необходимо внести небольшое количество органики

(например, порядка 10 мг/л глюкозы), чтобы стимулировать деление клеток бактерий и сделать их чувствительными к данным антибиотикам.

3. Антибиотики, ингибирующие синтез клеточных стенок, нужно комбинировать с антибиотиками, ингибирующими синтез белка, в смеси или серии последовательных обработок.

Число возможных вариантов для перебора стремится к бесконечности, поэтому предпочтительно тестировать максимально большое число вариантов обработки в одном эксперименте. Для этого водоросли высевают на агаризованную среду в чашки Петри. На поверхности среды раскладывают маленькие кусочки фильтровальной бумаги, смоченные в различных вариантах растворов антибиотиков. Схема их расположения должна быть тщательно задокументирована. Примерно через сутки чашку Петри помещают на предметный столик микроскопа, кусочки фильтровальной бумаги снимают пинцетом и просматривают площадь под ними. Выбирают тот вариант обработки, при котором на агаре наблюдается деление клеток водорослей, а рост бактериальных колоний отсутствует.

В таблице по данным литературы приведены ориентировочные диапазоны концентраций химических веществ, обычно используемых для выделения бактериологически чистых культур, и примерное время обработки.

| Бактерицидный агент | Концентрации | Время экспозиции |
|--|---|--------------------|
| <u>Антисептики:</u> | | |
| Риванол | 0,01–0,1 % | от 4–5 ч до 3 сут. |
| Йод | 1–2 капли на 50 мл среды $6 \cdot 10^{-4} - 4 \cdot 10^{-3}$ М | 1–2 мин |
| Фенол | 0,01–1 % | - |
| Этанол | 1–10 % | - |
| Детергенты (ДСН, лаурилсульфат натрия) | 1 % | - |
| Сок ягод клюквы или брусники | 0,01–0,5 % 5-процентного экстракта (в расчете на сухой вес ягод) | 10–15 сут. |
| Кофеин | 0,01–0,03 М | - |
| K_2TeO_3 (теллурит) | 10 мг/л ($3,9 \cdot 10^{-5}$ М) | - |

| | | |
|---|---------------------------------|-------------|
| Лизозим | 1 г/л ($5 \cdot 10^{-6}$ М) | - |
| <u>Антибиотики:</u> | | |
| Пенициллин | 145–3030 мкг/мл | - |
| Грамицидин | 40–1000 мкг/мл | - |
| Аурантин | 0,5–100 мкг/мл | - |
| Стрептомицин | 5–2000 мкг/мл | - |
| Левомецетин | 0,5–200 мкг/мл | - |
| Колимицин | 3–226 мкг/мл | - |
| Хлортетрациклин | 5–1000 мкг/мл | - |
| Окситетрациклин | 5–1000 мкг/мл | - |
| Тетрациклин | 10–50 мкг/мл | - |
| Полимиксин | 1–150 мкг/мл | - |
| Эритромицин | 0,5–100 мкг/мл | - |
| Гриземин | 1–100 мкг/мл | - |
| Нистатин | 5–100 мкг/мл | - |
| Кандицидин | 0,5–50 мкг/мл | - |
| Трихотецин | 1–100 мкг/мл | - |
| Левомецетин + стрептомицин | 1 мг/мл | 4 часа |
| | 1000 ед./мл | |
| Пенициллин + стрептомицин | 15 000–30 000 ед./мл | 1 сут. |
| | 12 500–25 000 ед./мл | |
| Пенициллин + стрептомицин + гентамицин | 10 мкг/мл | 15–48 часов |
| | 25 мкг/мл | |
| | 25 мкг/мл | |
| Пенициллин + хлорамфеникол + неомицин + актидион | 2500 мкг/мл | 24–48 часов |
| | 200 мкг/мл | |
| | 200 мкг/мл | |
| | 400 мкг/мл | |

Примечание: - – нет данных

К *физическим методам* бактериологической очистки культуры относят обработку ультрафиолетом и ультразвуком, высокой температурой (прогревание культур в кипящей воде). Действие этих факторов на культуру водорослей также должно быть кратковременным. Параметры воздействия подбираются экспериментально. Для ультрафиолета подбирают

мощность ламп, расстояние от них до культуры, время экспозиции. Следует помнить, что ультрафиолет не проникает через стекло и практически не проникает в воду, поэтому обработке подвергают открытые чашки Петри с культурой, высеянной на поверхность агаризованной среды. Для ультразвука экспериментально подбирают мощность излучателя, частоту, амплитуду и время экспозиции. Водоросли с сифональной структурой морфологической дифференциации (*Acetabularia*) очень чувствительны к ультразвуку. Для них время обработки обычно измеряется секундами.

Ориентировочные параметры обработки культур водорослей ультрафиолетом и ультразвуком:

| Обработка | Мощность источника | Длина волны/частота | Расстояние от источника | Время экспозиции |
|--------------|----------------------------|---------------------|-------------------------|------------------|
| Ультрафиолет | БУВ–20 БУВ–40 ПРК–10 | 240–280 нм | 20–30 см | 1–20 мин |
| Ультразвук | 5 кВ | 20 кГц | - | 5–30 мин |

Примечание: - – нет данных

Различные методы и составы антисептиков и антибиотиков комбинируют и повторяют до успешного выделения бактериологически чистой культуры. Бактериальную чистоту полученной культуры контролируют отсевом на контрольную среду с органическими источниками углерода.

Не все культуры сохраняют жизнеспособность после обработок, всего несколько пробирок из 20–40 оказываются живыми и аксеничными. Поэтому выделение бактериологически чистых культур проводится в многократных повторностях.

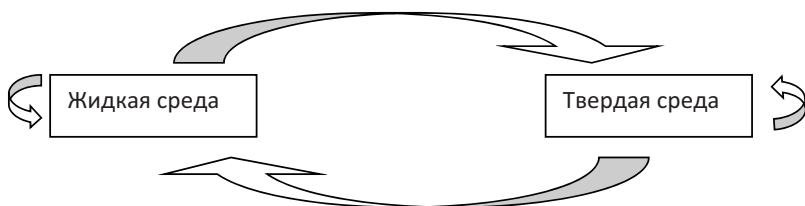
Контроль и поддержание чистоты культур. Контроль альгологической чистоты культур проводят их периодическим микроскопированием. Культуры могут загрязняться другими видами водорослей, зооконтаминантами, водными грибами. Контроль бактериологической чистоты культур осуществляют, делая посеvy из культуры на среды с органическими источниками углерода. Появление белесой мути свидетельствует о бактериальном заражении культуры.

При необходимости очистки культур от посторонних организмов проводят повторное выделение альгологически и бактериологически чистых культур из загрязненной культуры.

Культуры некоторых видов водорослей (*Chlorella*) могут поражаться вирусами, что является большой проблемой в промышленной культуре. При поражении вирусной инфекцией культуру уничтожают, все оборудование стерилизуют и проводят посев новой здоровой культуры.

2.1.4. Методы посева и условия культивирования

При пересеве культур водорослей на свежую среду возможны следующие варианты:



Пересев *с жидкой среды на жидкую среду* проводят, приливая небольшой объем пересеваемой культуры, называемый **инокулятом**, к свежей питательной среде. Для лучшего освещения и газообмена объем культуры в колбе должен быть таким, чтобы толщина слоя жидкости не превышала 3 см.

Пересев *с жидкой среды на твердую среду* можно проводить различными способами. Небольшой объем инокулята выливают на поверхность агаризованной среды в чашке Петри. Жидкость распределяют по поверхности твердой среды стеклянным шпателем. Объем инокулята должен быть таков, чтобы примерно через сутки вся жидкость впиталась в агар.

Инокулят можно предварительно сгустить центрифугированием, и осадок клеток нанести на поверхность агаризованной среды микробиологической петлей (по типу микробиологических посевов).

Жидкий инокулят смешивают со свежеприготовленной агаризованной средой, охлажденной до 38–40 °С, разливают

по чашкам Петри и помещают в прохладное место для скорейшего охлаждения. При таком способе посева клетки водорослей будут формировать колонии в толще питательной среды.

Пересев *с твердой среды на твердую среду* проводят микробиологической петлей по типу микробиологических посевов.

Пересев *с твердой среды на жидкую среду* проводят, смывая клетки водорослей с поверхности агара свежей питательной средой в колбу, либо помещая кусочки агара с водорослями в свежую жидкую питательную среду. В последнем случае, как считают, водоросли лучше адаптируются к смене условий культивирования, культура лучше развивается на границе раздела фаз и лучше растет.

При пересеве культур водорослей на новом культивационном сосуде (колбе, чашке Петри, пробирке) делают надпись, указывая вид водорослей, штамм, номер колбы, дату посева, дату предыдущего посева. Пересев культур также регистрируют в специальном лабораторном журнале. Можно использовать форму в виде таблицы.

| № | Вид | Штамм | Дата посева | Дата предыдущего посева | Примечание |
|----|--------------------------------|-------|-------------|-------------------------|--|
| 1. | <i>Dunaliella salina</i> Teod. | IBSS1 | 12.08.2010 | 12.07.2010 | Переведена со среды Артари на среду «морская соль» |
| 2. | ... | ... | ... | ... | ... |

В графе «Примечание» указывают любую дополнительную информацию, касающуюся изменения условий культивирования и результатов микроскопирования культур и наблюдения за ними. Особенно важно отмечать информацию, которая пригодится при составлении или дополнении паспорта штамма.

Для культивирования водорослей в лаборатории организуют специальный стеллаж, снабженный источниками света – светоустановку. Современное светотехническое оборудование позволяет подбирать интенсивность и спектр освещения с помощью разнообразных ламп и регулировать периодичность освещения при помощи таймеров. Чаще всего в лаборато-

рии пользуются лампами дневного света, устанавливают освещенность – 5–8 клк, режим освещения – круглосуточный или 16 часов свет, 8 часов – темнота. Температура на светостановке должна быть 25–28 °С, для термофильных штаммов – до 35–38 °С. По сравнению с микроводорослями культуры макроводорослей требуют меньшей интенсивности света (в 10–100 раз) и более низких температур (5–10 °С для холодолюбивых видов, 20 °С – для тропических). Для культивирования криофильных водорослей необходимо предусматривать систему охлаждения. Обязательным условием выращивания водорослей в лаборатории является периодическое (например, 1 раз в сутки) перемешивание культур для лучшего газообмена и предотвращения осаждения и адгезии водорослей к стенкам, поскольку образование толстых слоев биомассы может приводить к нарушению газообмена, гибели водорослей и самоотравлению культуры продуктами распада.

2.1.5. Ведение стерильной культуры водорослей

Альгологически чистую культуру на среде, содержащей только минеральные компоненты, можно вести в условиях так называемой «относительной стерильности». Такие культуры редко заражаются посторонними организмами. Для поддержания их альгологической чистоты достаточно просто пользоваться чистой посудой.

Бактериологически чистые культуры необходимо вести в стерильных условиях. Стерильные условия также желательны для альгологически чистых культур, поддерживаемых в банках культур.

Ведение культуры в стерильных условиях предусматривает стерилизацию всех инструментов, посуды, питательных сред и пересев культур в стерильных боксах, сконструированных по типу изоляторов или ламинаров. В боксе-изоляторе должно отсутствовать перемещение воздуха. Такой бокс может быть импровизированным, изготовленным из подручных средств в лаборатории. В ламинарном боксе воздух, простерилизованный ультрафильтрацией через бактериальные фильтры, поступает в рабочее пространство сверху ламинарным

потоком, без завихрений, способных внести нестерильный воздух из помещения.

Металлические инструменты, стеклянную посуду, ватно-марлевые пробки, фольгу стерилизуют в сухожаровых шкафах. Пластиковую посуду протирают или замачивают в 70 % этиловом спирте. Питательные среды можно стерилизовать кипячением, пастеризацией, тиндализацией, микроволновым облучением, но автоклавирование является предпочтительным. Растворы термолабильных компонентов питательных сред (витаминов, регуляторов роста) стерилизуют фильтрацией через мембранные фильтры и вносят в стерильные среды в боксе перед посевом водорослей. Рабочие поверхности в боксе дезинфицируют последовательной обработкой хлорсодержащим стерилизующим агентом (гипохлорит натрия, хлорамин), 70% этиловым спиртом, ультрафиолетом. Ориентировочные режимы стерилизации и дезинфекции приведены в таблице.

| Оборудование и материалы | Метод стерилизации/дезинфекции | Режимы стерилизации | Время стерилизации |
|--|--|---|--|
| Термостойкие материалы посуда и инструменты | Сухо-жаровой шкаф | 150 °С | 3–4 часа |
| Нетермостойкая посуда | Обработка спиртом | 70 % этанол | обработка поверхностей или погружение на 30–60 мин |
| Посуда и питательная среда | Автоклавирование | давление 0,5–1 атм., температура 115–120 °С | 30–60 мин |
| Растворы термолабильных компонентов питательных сред | Вакуум-фильтрация через мембранные фильтры | диаметр пор 0,2 мкм | |
| Подготовка бокса | Последовательно: 1. Гипохлорит натрия. 2. Обработка спиртом. 3. Ультрафиолет* | 70 % этанол 260 нм | 40 мин |

* При обработке бокса ультрафиолетом необходимо соблюдать правила техники безопасности: не смотреть на лампы, покинуть помещение на время обработки, после отключения ламп покинуть помещение на 15 минут – для разложения озона. Затем можно приступать к работе.

Посев стерильных культур в боксе ведется за пламенем горелки, либо, что более надежно, между пламенем двух горелок, в соответствии с теми же правилами и процедурами, что и микробиологические посевы.

Как показывает опыт, простого соблюдения режимов стерилизации и правил осуществления посевов недостаточно для успешного ведения стерильных культур водорослей. Все действия по стерилизации материалов и оборудования и пересеву культур должны проводиться осознанно, с пониманием моментов, когда возможна расстерилизация, и принятием мер по ее предотвращению.

Так, например, простерилизованную в сухо-жаровом шкафу или автоклаве посуду необходимо выставлять в бокс горячей перед обработкой ультрафиолетом. Если этого не планируется, посуду стерилизуют завернутой в бумагу, которую затем снимают непосредственно перед выставлением в бокс. Если посуду стерилизовали без заворачивания в бумагу, и она остыла в нестерильной зоне, поверхность посуды перед выставлением в бокс протирают ватой, смоченной 70 % спиртом, который должен быть заранее приготовлен, и стоять в боксе в протертом тем же спиртом снаружи пузырьке. Колбы с культурами, предназначенными для пересева, также протирают 70 % спиртом.

Не следует слишком надеяться на стерилизующее действие ультрафиолета. Ультрафиолет эффективно стерилизует только чистые горизонтальные поверхности.

Рабочий халат должен быть чистым, проглажен утюгом и упакован в новый полиэтиленовый пакет. Его необходимо одевать непосредственно перед работой в боксе. Руки перед посевом в боксе нужно обрабатывать 70 % спиртом. При работе в стерильном боксе следует совершать минимум движений, движения должны быть медленными, не создающими перемещения воздуха. Руки из стерильной зоны желательно не выносить.

Следует помнить, что любой инструмент, вынесенный за пределы стерильной зоны во время посева, стерильным уже не является. Прежде чем вернуть его в стерильную зону, необходимо протереть данный инструмент (и руки) 70 % спиртом, а если он устойчив к огню – еще и обжечь в пламени горелки.

Соблюдение подобных предосторожностей позволит снизить вероятность заражения культур посторонними организмами.

2.1.6. Контроль динамики роста культур

Методы контроля динамики роста культур можно разделить на прямые и косвенные. К прямым методам относится определение показателей, в приросте которых собственно и заключается рост культуры – концентрации организмов и биомассы. Недостатком прямых методов является необходимость изъятия из культуры материала, который в случае макроводорослей не является многочисленным.

К косвенным методам относится определение показателей, которые косвенно связаны с приростом концентрации организмов и биомассы. При косвенных методах показания могут сниматься с объекта (оптическая плотность культуры, морфометрия – для макроводорослей, интенсивность фотосинтеза, накопление органического вещества и фотосинтетических пигментов, содержание азота и фосфора, мембранный потенциал) либо со среды (убыль биогенов, концентрации газов – O_2 и CO_2 , pH). Косвенные методы требуют калибровки по прямым. Для макроводорослей предпочтение должно отдаваться методам, которые не требуют даже временного извлечения водорослей из среды, так как оно оказывает шоковое воздействие на объект и сказывается на дальнейшем росте.

Определение концентрации микроводорослей в культуре проводят путем *подсчета их числа в счетных камерах*. Назначение счетных камер – создавать известный объем, в котором можно непосредственно подсчитать число экземпляров. Счетные камеры представляют собой предметное стекло с разметкой, показывающей площадь подсчета, разбитую на единицы – большие и малые квадраты. Подсчет числа водорослей можно вести над любой площадью. Площадки с разметкой площади находятся на стекле на большей глубине, чем боковые площадки без разметки. Это придает счетной камере помимо площади подсчета еще и глубину.

При подсчете числа водорослей в счетных камерах руководствуются следующими правилами:

1. Камеру и покровное стекло ополаскивают дистиллированной водой и насухо вытирают. Перед внесением культуры водорослей в камеру покровное стекло должно быть плотно, до появления колец интерференции, притерто к боковым площадкам счетной камеры (их можно предварительно слегка смочить водой).

2. Культуру тщательно перемешивают, пипеткой отбирают каплю культуры и быстро, чтобы водоросли не успели осесть в кончике пипетки, вносят небольшой объем в зазор между покровным стеклом и камерой. Объем внесенной культуры должен быть достаточным для равномерного заполнения камеры, но не слишком большим. Недопустимо нарушение колец интерференции избытком внесенной культуры. Клетки должны быть равномерно распределены по площади камеры.

3. Подсчитывают число экземпляров, которые находятся внутри учитываемых квадратов разметки, а также лежат на одной из горизонтальных сторон и одной из вертикальных сторон каждого квадрата. Вращают микровинт микроскопа, чтобы просмотреть всю глубину камеры. Для монадных форм подсчитывают все экземпляры, которые побывали за время подсчета в учитываемом квадрате, руководствуясь соображением, что существует равная вероятность, что одна клетка попала в зону учета, а другая в то же время ее покинула. Высокоподвижные монадные формы для удобства подсчета можно фиксировать, помещая заполненную счетную камеру в кристаллизатор с парами иода или осмиевой кислоты. Можно отобрать в отдельную пробирку небольшой объем культуры и зафиксировать каплей раствора Люголя или любого фиксатора, не нарушающего целостность клеток (глутаровый альдегид, уранил ацетат, формалин).

4. Количество квадратов, в которых ведется подсчет, и/или количество аналитических повторностей должно быть таким, чтобы число непосредственно пересчитанных объектов было не менее 100. Если подсчет ведется не во всем объеме камеры, можно выбрать ряд квадратов по диагонали.

5. Расчет концентрации водорослей проводят на основании полученных данных подсчета и параметров камеры, которые указаны непосредственно на ней или в инструкции к каме-

ре. Производители всегда указывают площадь самого малого квадрата камеры или площадь малого и большого квадрата. Для всех вариантов камер и техники подсчета ниже приведена обобщенная формула:

$$C = \frac{N}{n \cdot h \cdot s} ,$$

где N – подсчитанное число экземпляров;

n – число квадратов, в которых велся подсчет;

h – глубина камеры;

s – площадь квадрата.

Чаще всего параметры камеры приводятся в мм, и полученная концентрация клеток выражается в клетках на 1 мм³. В экспериментальной альгологии концентрацию клеток водорослей принято выражать в млн клеток на 1 мл. Для перевода в эти единицы полученный результат делят на 1 000 000 и умножают на 1 000 (количество мм³ в 1 мл (см³)).


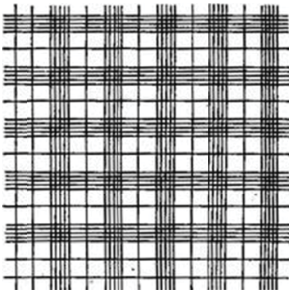
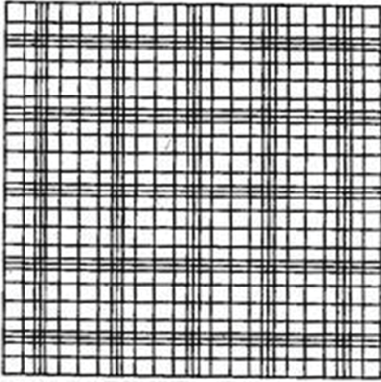
При помощи счетных камер можно определять концентрации не только одноклеточных водорослей, но и ценобиальных, колониальных, нитчатых. При этом стараются вести учет как числа индивидуумов, так и количества клеток, образующих индивидуум.

Существует большое разнообразие счетных камер, отличающихся глубиной, площадью и формой разметки. Это позволяет подсчитывать число организмов разного размера при их разной концентрации в культуре с тем, чтобы учесть не менее 100 экземпляров. В таблице приведены наиболее часто используемые камеры отечественного производства и их характеристики, а также концентрации и размер клеток, при которых данной камерой удобно пользоваться.

При *определении биомассы* водоросли отделяют от питательной среды фильтрованием или центрифугированием. Биомассу водорослей помещают на любой предварительно взвешенный носитель (фильтр, фольга, пробирка, стаканчик и т. д.) и взвешивают. Полученный показатель называют *сырой массой*. Сырая масса не является достаточно точным по-

казателем, так как зависит от содержания жидкости во взвешиваемом осадке.

Для более точных измерений биомассу водорослей, отделенную от питательной среды указанными способами про-

| Название камеры | Параметры камеры | | | Концентрация клеток, в 1 мл | Размер клеток, мкм |
|------------------------|------------------|--|------------------------|-----------------------------|--------------------|
| | Глубина, мм | Максимальная площадь подсчета, мм ² | Объем, мм ³ | | |
| Камера Тома-Цейса | 0,1 | 16x16 квадратов по 1/400  | 0,064 | $\sim 10^6$ | 5–15 |
| Камера Горяева | 0,1 | 15x15 квадратов по 1/25  | 0,9 | 10^4 – 10^6 | 5–75 |
| Камера Фукса-Розенталя | 0,2 | 16x16 квадратов по 1/16  | 3,2 | 10^4 – 10^5 | 5–75 |

Примечание: масштаб разметки x12

мывают водой от солей, содержащихся в питательной среде, и высушивают в сушильном шкафу при 30–50 °С (более низкие щадящие температуры предпочтительны, если будут определяться термолабильные компоненты биомассы). Фильтр, либо любой другой носитель, должны быть предварительно взвешены в сухом состоянии. В ходе высушивания биомассу периодически достают из сушильного шкафа и взвешивают. Высушивание ведется до тех пор, пока вес не перестанет изменяться. Полученный показатель называют *постоянной сухой массой*. Постоянная сухая масса также имеет существенную погрешность, зависящую от влажности воздуха в лаборатории.

Наиболее точным показателем биомассы, не зависящем от влажности воздуха, является *абсолютная сухая масса* (абсолютный сухой вес, АСВ). Для определения АСВ биомассу, отделенную от питательной среды и промытую от остатков солей, помещают в предварительно взвешенный стеклянный бюкс с притертой крышкой. Бюкс вместе с крышкой помещают в сушильный шкаф в открытом состоянии. Высушивание также ведут до постоянной сухой массы, но в отличие от предыдущего метода, бюкс взвешивают закрытым, чтобы не допустить попадание в него влаги из воздуха.

Для нитчатых водорослей метод определения биомассы является более точным, чем подсчет в счетной камере.

Из косвенных методов контроля динамики роста культур для микроводорослей наиболее принятыми являются объемно-весовой метод и метод определения оптической плотности. Их преимущество перед прямыми в их экспресс-характере.

При *объемно-весовом методе* определенный объем культуры центрифугируют в запаянных капиллярах с разметкой объема. Можно использовать гематокритные капилляры или пробирки, специально изготовленные из стеклянных пипеток. Капилляры заполняют известным объемом культуры и центрифугируют при 3 000 об./мин. Определяют объем осадка. Для расчета биомассы можно принять, что 1 см³ осадка клеток весит 1 г, а можно откалибровать метод по биомассе.

Метод определения оптической плотности культуры заключается в ее измерении при помощи фотоколориметра или

спектрофотометра при определенной длине волны. Для измерений можно выбрать произвольную длину волны. Если позволяет оборудование, можно производить измерения при длине волны 750 нм. В этом случае результат будет зависеть от мутности суспензии клеток и не зависеть от содержания пигментов в них, что способствует точности измерения. Однако на практике длину волны подбирают, руководствуясь рядом соображений. Чаще длину волны подбирают для каждого вида индивидуально. Для этого определяют и строят график спектра поглощения культуры (зависимости оптической плотности от длины волны). Для дальнейшей работы выбирают точки экстремума – в них показания наиболее стабильны. При наличии в спектре поглощения минимумов и максимумов минимум выбирают, если собираются работать с концентрированными культурами, максимум – если с культурами с низкой концентрацией клеток. Это повышает чувствительность метода. Края спектра выбирать избегают из-за нестабильности показаний в них. После того, как длина волны выбрана, метод калибруют по концентрации клеток или биомассе.

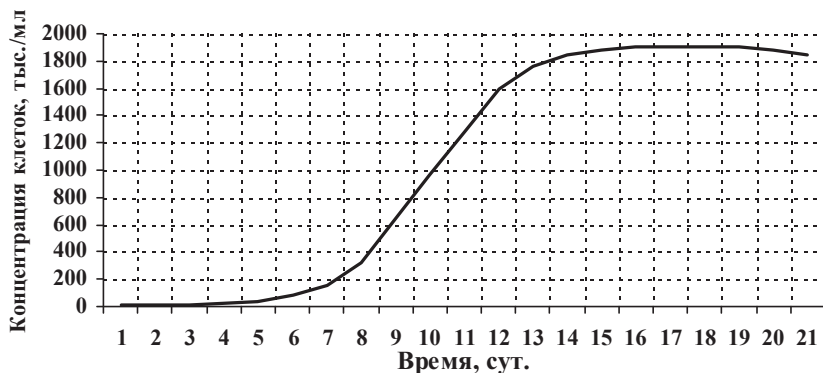
При калибровке косвенных методов контроля динамики роста культуры готовят не менее 5 вариантов разведения культуры не менее, чем в 3 повторностях. В каждом разведении проводят определение косвенного показателя и прямого. С помощью соответствующих компьютерных программ строят график, на котором по оси абсцисс откладывают результаты косвенного метода, по оси ординат – результаты прямого определения. Можно пользоваться этим графиком как калибровочным, а можно провести регрессионный анализ и получить уравнение регрессии для определения концентрации клеток или биомассы по оптической плотности культуры или объему осадка биомассы. Обычно регрессия линейная.

Следует заметить, что прямые методы контроля динамики роста культур являются более точными и они предпочтительны при биохимическом анализе биомассы и расчете содержания компонентов на клетку или единицу биомассы. Косвенные методы предпочтительны, если требуется оперативный контроль динамики роста.

2.1.7. Типичные кривые динамики роста культур

Типичная динамика роста культуры описывается так называемой сигмоидной (логистической) кривой. В ней выделяют ряд фаз. Механизмы, лежащие в основе смены фаз роста культуры еще не вполне ясны и объяснения этого явления носят гипотетический характер.

Динамика роста культуры микроводорослей



1. **Лag-фаза** – фаза временной задержки роста культуры. Это явление связывают с тем, что возможно клеткам в инокуляте необходимо адаптироваться к новым условиям освещения и питания после пересева. Как считают, особое значение имеют концентрации микроэлементов, которые в свежей среде могут находиться в избытке и даже оказывать токсическое действие на водоросли. Лag-фаза тем длиннее, чем «старше» исходная культура, из которой взят инокулят, то есть, чем более отличаются условия в ней от свежепересеянной культуры. Одним из механизмов адаптации клеток к новым условиям после пересева считают накопление в среде экзометаболитов (предположительно, хелаторов ионов металлов) в определенной концентрации, необходимой для начала деления клеток. Возможно, поэтому чем больше клеток в инокуляте, тем короче лag-фаза.

2. **Экспоненциальная, логарифмическая лог-фаза** – фаза наиболее активного роста культуры. В этой фазе культура

обладает максимально возможной скоростью деления клеток для данных условий среды. Концентрация клеток растет в геометрической прогрессии. Фаза экспоненциального роста, как правило, очень короткая.

3. Фаза линейного роста. Переход от экспоненциальной зависимости к линейной указывает на лимитирование роста. Рост культуры может быть лимитирован концентрацией биогенов в среде, освещенностью клеток в их густой суспензии, а также, возможно, накоплением экзометаболитов, ингибирующих деление клеток. Длительный рост культуры в соответствии с линейным законом может означать, что какой-то лимитирующий ресурс поступает в культуру с постоянной скоростью. При достаточной концентрации биогенов в питательной среде таким ресурсом может быть CO_2 , поступающий в среду из атмосферы взамен поглощенного клетками водорослей.

4. Фаза замедления роста. По мере того, как концентрация клеток в культуре увеличивается, происходит истощение биогенов в питательной среде, самозатенение в культуре и накопление в среде ингибиторов роста. Вследствие этого рост культуры замедляется до полной остановки.

5. Стационарная фаза. Концентрация клеток в культуре не увеличивается. Деление клеток либо прекращается полностью, либо происходит с той же скоростью, что и лизис отмирающих клеток, возможно, за счет происходящего при этом освобождения ресурсов. Стационарная фаза может быть довольно длительной.

6. Фаза отмирания культуры. Скорость отмирания клеток начинает превышать скорость их деления. Возможно, это происходит из-за медленного освобождения ресурсов из отмершей биомассы либо из-за накопления токсичных продуктов распада.

Чтобы не допустить отмирания культуры, ее необходимо пересевать на свежую питательную среду до наступления фазы отмирания. Для большинства культур микроводорослей фаза отмирания может наступить уже через месяц. Культуры макроводорослей можно поддерживать без смены питательной среды в течение нескольких месяцев.

В экстенсивной культуре, как правило, пересев осуществляют периодически, при достижении культурой стационарной фазы. Такую культуру называют *периодической*. Культуру можно «задержать» на любой фазе роста, в любой точке кривой динамики роста, разбавляя ее свежей питательной средой. Динамика роста такой культуры превращается в прямую линию. Такую культуру называют *непрерывной*. Чтобы объем непрерывной культуры не увеличивался, перед добавлением питательной среды равный ей объем изымается из культуры. Поскольку в непрерывной культуре сбор урожая и добавление среды должны происходить непрерывно, ведение непрерывной культуры требует автоматического оборудования. Управление непрерывной культурой может вестись от датчика оптической плотности культуры (мутности). Свежая среда добавляется, как только оптическая плотность культуры превысит заданное значение. Такую непрерывную культуру называют *турбидостат*. Управление может вестись от датчика, регистрирующего концентрацию какого-либо лимитирующего рост биогена. В культуру добавляется сбалансированная среда, содержание биогенов в которой равно их выносу с собранной биомассой. Такая непрерывная культура называется *хемотат*.

В отсутствие автоматического управления пересев можно вести с некоторой минимальной периодичностью (например, 1–3 сут.). Такая культура представляет собой промежуточный между периодической и непрерывной культурой вариант и получила название *полунепрерывной* (квази-, семи-, геми-непрерывной).

2.1.8. Контроль физиологического состояния клеток в культуре

Методы определения физиологического состояния клеток водорослей в культуре в литературе часто называют определением числа «живых и мертвых» клеток. Это не совсем верно. Отличить под микроскопом живые клетки водорослей от мертвых и начавших необратимо разрушаться, как правило, невозможно, поэтому определяют показатели физиологических функций, угнетение которых может косвенно

свидетельствовать о гибели клеток, но оно также может быть связано и с их переходом в покоящуюся стадию или какими-либо адаптивными перестройками. Поэтому для одной и той же культуры результаты, полученные разными методами определения условно «живых и мертвых» клеток, могут существенно различаться.

О физиологическом состоянии культуры судят при помощи подсчета не менее 100 клеток под микроскопом и вычисления процента клеток с активной или угнетенной физиологической функцией, на которой основан метод.

Флуоресценция клеток водорослей под флуоресцентным микроскопом (435 нм) указывает на *интенсивность фотосинтеза*. Активно фотосинтезирующие клетки флуоресцируют красным, клетки с угнетенным фотосинтезом – зеленым. В культуре обычно наблюдается ряд промежуточных переходов от красной флуоресценции, через желтую к зеленой. Анализ необходимо проводить быстро, так как длительная выдержка клеток водорослей под ультрафиолетом, генерируемым ртутной лампой микроскопа, сама по себе ведет к подавлению фотосинтеза и выцветанию пигментов.

Использование различных красителей позволяет оценить *состояние плазматической мембраны* клеток водорослей. Окрашивание клеток так называемыми витальными красителями, которые поглощаются клетками водорослей путем активного транспорта (например, нейтральный красный), свидетельствует об активном трансмембранном транспорте. Ряд красителей (например, трипановый синий, нигрозин, азор, эритрозин, эозин), напротив, окрашивают только клетки с поврежденной мембраной.

Использование трифенилтетразолий хлорида (ТТХ) позволяет оценить *восстанавливающую способность* клетки. ТТХ перехватывает водород восстановленных пиридин-нуклеотидов (НАДН_2 и НАДФН_2), восстанавливаясь в кристаллическое вещество ярко-красного цвета – формазан. Клетки, в которых образование восстановительных эквивалентов угнетено по какой-либо причине, не окрашиваются ТТХ.

В качестве показателей жизнеспособности и физиологического состояния клеток водорослей иногда используют гисто-

химические тесты на **активность различных ферментов** (аскорбатоксидазы, цитохромоксидазы).

Способность клеток культуры к делению определяют, высевая культуру на поверхность агаризованной среды в чашки Петри. Через определенное время (3–5 сут.) поверхность агара просматривают под микроскопом. Учитывают клетки, которые поделились и дали начало дочерним клеткам и целым колониям, и клетки, которые остались одиночными. Эти клетки могут начать делиться через более продолжительное время, поэтому необходимо отмечать время от момента посева культуры, когда велся подсчет.

2.1.9. Стандартизация культур водорослей и организация экспериментальной работы с культурами в лаборатории

При контаминации культуры микроводорослей посторонними организмами или при изменении физиологического состояния клеток в культуре, нельзя гарантировать воспроизводимость результатов экспериментов и статистическую значимость обнаруживаемых эффектов. Для успешного проведения экспериментальных работ, объектом которых служат микроводоросли, лаборатория должна быть обеспечена моновидовым материалом, характеризующимся постоянством физиолого-биохимических свойств. Для этого организуют ведение 3 типов культур.

Коллекционная культура – служит цели поддержания альгологической (или бактериологической) чистоты культуры при пересеве. Пересев культуры ведется в стерильных условиях на простерилизованные питательные среды с использованием стерильной посуды и других материалов. Периодичности пересевов и объему пересеваемого инокулята уделяется не столь существенное внимание. Если происходит контаминация коллекционной культуры, проводят ее очистку с использованием описанных выше методов выделения альгологически или бактериологически чистых культур.

Маточная культура – служит цели поддержания постоянного функционального (физиолого-биохимического) состояния клеток в культуре. Известно, что состояние клеток

в культуре зависит от условий культивирования и от времени, прошедшего с момента последнего пересева культуры, – так называемого популяционного возраста культуры. На состояние клеток в культуре после пересева влияет также популяционный возраст и состояние инокулята, а также исходная концентрация клеток. Маточную культуру высевают из коллекционной и ведут с соблюдением постоянства ряда условий, которые принимаются каждой лабораторией в качестве стандартных и указываются при публикации результатов исследования в разделе «Материалы и методы». Стандартизации подлежат условия культивирования (состав питательной среды, тип культивационного сосуда, освещенность, температура и т. д.), периодичность пересева и исходная концентрация клеток в культуре. Концентрацию клеток в культуре контролируют с помощью прямых или косвенных методов, описанных выше. При ведении маточных культур меньше внимания уделяется соблюдению условий стерильности. В случае контаминации маточных культур они возобновляются из коллекционной культуры.

Экспериментальные культуры – служат непосредственно для получения экспериментальных данных. Их высевают из маточных культур определенного одинакового популяционного возраста и задают одинаковую исходную концентрацию клеток, если иного не требуют задачи эксперимента. За одну статистическую повторность принимают культуру в одном культивационном сосуде (например, колбе). Общее число колб определяется необходимым числом повторностей и планом эксперимента. Планирование эксперимента с водорослями осуществляют по общепринятым правилам. План однофакторного эксперимента должен предусматривать контроль и варианты опыта, соответствующие грациям фактора, действие которого на культуру водорослей изучается. План многофакторного эксперимента предусматривает варианты опыта, соответствующие различным сочетаниям значений исследуемых факторов. Факторы, которые не участвуют в эксперименте, должны действовать на все экспериментальные культуры одинаково. Все колбы с экспериментальными культурами размещают на полке светоустановки в случайном

порядке, который периодически меняют также случайным образом, чтобы для всех вариантов опыта и всех повторностей была одинакова вероятность воздействия факторов, которые исследователь не в состоянии контролировать (таких, например, как градиент освещенности и колебания температуры в помещении и на полке светоустановки).

2.2. Промышленная культура

2.2.1. Цели и задачи промышленного использования водорослей

В практику производства внедрен ряд биотехнологий, использующих водоросли. В общем случае цели использования водорослей совпадают с целями использования других микроорганизмов в биотехнологии. *Целью* альготехнологий могут быть:

- *биомасса* водорослей как источник специфических ингредиентов;
- *жизнедеятельность* водорослей как фактор улучшения состояния окружающей среды и организмов;
- *физиологические реакции* водорослей как тест-функции для оценки действия различных факторов и веществ на биологические системы.

Небольшая часть альготехнологий вполне традиционны, особенно для ряда стран; большинство являются инновационными.

Использование биомассы водорослей. Уникальной особенностью водорослей является состав их биомассы и пластичность обмена веществ. Биомасса водорослей содержит белок со всеми незаменимыми аминокислотами, эссенциальные, в том числе ω^3 , жирные кислоты, витамины, микроэлементы, различные специфические биологически активные вещества. Некоторые виды водорослей по калорийности близки к шоколаду, а комплекс биологически активных веществ, зачастую еще не установленного состава, может оказывать общеукрепляющее и стимулирующее действие на организм

человека. Изменяя условия культивирования водорослей можно добиться управляемого изменения состава биомассы и направленного синтеза целевых компонентов. Более рентабельным, чем производство биомассы оказалось производство отдельных компонентов, высокая рыночная цена которых компенсирует затраты на культивирование водорослей.

С использованием биомассы водорослей, а также выделенных из нее в чистом виде веществ решается ряд задач в различных отраслях промышленности.

В пищевой промышленности водоросли позволяют решать задачи производства следующей продукции:

Продукты питания – данное использование водорослей имеет многовековую историю в странах Юго-Восточной Азии (Япония, Китай, Корея, Филиппины), хотя в рационе жителей этих стран водоросли являются не основной пищей, а, скорее, деликатесом. В основном, это макроводоросли. Раньше они добывались путем промысла, в настоящее время наблюдается постепенный переход от промысла к аквакультуре, с различной степенью контроля условий выращивания. Выращивание пищевых макроводорослей – масштабная коммерческая индустрия. Мировой объем производства нори (*Porphyra*), одного из ингредиентов традиционной японской кухни, составляет более 1 млн. тонн в год (более 1,8 млрд. долларов США в год), комбу (морская капуста, *Laminaria*) – более 4 млн. тонн в год (более 2,8 млрд. долларов США в год), вакамэ (*Undaria*) – более 450 тыс. тонн в год (около 150 млн. долларов США).

Что касается микроводорослей, известно, что лепешки из *Spirulina* считались священной пищей древней цивилизации ацтеков в Южной Америке и входят в рацион современных жителей республики Чад в Африке.

Технологические пищевые добавки – из ингредиентов водорослевого происхождения наиболее широкое применение в качестве технологических пищевых добавок получили так называемые фикоколлоиды – желеобразующие агенты. Они придают продуктам питания желеобразную или просто густую консистенцию, защищают их от обсыхания (черствления), прогоркания (окисления), стабилизируют напитки от рассло-

ения и образования осадков (свертывания), а также предотвращают образование кристаллов льда при замораживании продуктов.

Пищевые добавки Е400–Е405 – это полисахарид бурых водорослей альгиновая кислота, а также ее соли и производные. Далеко не полный перечень продуктов, при приготовлении которых могут быть использованы альгинаты, включает мороженое, джем, желе, варенье, мармелад, зефир, пудинги, супы и бульоны, сосиски, колбасы, маргарин, молочные продукты, сливки, сыры, сиропы, напитки, пиво, хлеб, мороженую рыбу, креветки, мясо.

Пищевые добавки Е406–Е408 – это агар-агар и подобные ему полисахариды (каррагинан, фуцелларин) из красных водорослей. Они применяются в приготовлении мороженого, желе, пастилы, суфле, горячего шоколада, сырков, молока, сыра, хлеба, майонеза, мясных и рыбных консервов. Как правило, фикоколлоиды используются в развитых странах в приготовлении только достаточно дорогих сортов продуктов питания, хотя без них нельзя обойтись, например, при производстве мороженого и мармелада.

В качестве пищевого красителя разрешено использование смешанных каротиноидов из *Dunaliella salina* – Е160a(i). Перспективным является внедрение других пигментов водорослей для окрашивания продуктов питания – астаксантина, фикобилинов и других. Пигменты водорослей придают продуктам питания не только привлекательный цвет, но и продлевают срок их годности: обладая антиоксидантной активностью, они замедляют скорость порчи продуктов вследствие окисления.

Функциональные пищевые добавки – инновационным, но уже достаточно широко внедренным является использование биомассы водорослей в качестве функциональных (биологически активных) пищевых добавок (БАДов), оказывающих общеукрепляющее действие на организм человека. Разрабатаны и производятся БАДы на основе биомассы *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris* и *Ch. pyrenoidosa*, *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis* и многих других видов.

В фармацевтической промышленности спектр задач, которые решаются с использованием водорослей, значительно

уже теоретически возможного. Производство лекарств – самая жестко регламентируемая отрасль промышленности во всем мире. Фармация предпочитает чистые вещества или, в крайнем случае, смеси, состав которых можно легко охарактеризовать, проконтролировать и стандартизировать. Поэтому в фармации, особенно в западных странах, вещества природного происхождения редко применяются в официальной медицине.

Каждое вещество (в фармации называемое субстанция), а также препарат, в который оно входит (готовая форма) должны пройти длительные и дорогостоящие лабораторные, доклинические и клинические испытания, прежде чем будет получено разрешение на их применение. Разрешенные к применению субстанции и готовые формы внесены в официальные издания, называемые фармакопеями. На каждую субстанцию и готовую форму составляется аналитически-нормативная документация (АНД) – фармакопейная статья, регламентирующая качественный и количественный состав препарата, методы их контроля, требования к упаковке, хранению, применению и т. п. Поэтому внедрение новых препаратов в практику фармации – процесс длительный и требующий значительных вложений.

Поэтому официальные фармакопеи содержат весьма ограниченный перечень препаратов и ингредиентов из водорослей. В последнем, XI издании Государственной Фармакопеи СССР (ГФ СССР XI), которое легло в основу большинства национальных фармакопей стран постсоветского пространства (в том числе, ДФУ – Державної Фармакопеї України), имеется всего одна статья на препарат из водорослей – это статья 83 *Thalli Laminariae* (талломы ламинарии). Препарат используется в качестве слабительного.

Европейская Фармакопея (Eu.P.) и Фармакопея США (USP) содержат всего две статьи на субстанции из водорослей – агар-агар и альгиновую кислоту. Фикоколлоиды используются в производстве лекарств в качестве формообразующих компонентов, например, при изготовлении капсул.

В составе биомассы различных видов водорослей были выявлены вещества с различной терапевтической активностью: антимикробной, антиатеросклеротической, антиоксидант-

ной, антикоагуляторной, ранозаживляющей, противоязвенной, иммуномодулирующей, глистогонной. Ряд веществ водорослевого происхождения могут использоваться в качестве энтеросорбентов при отравлениях, заменителей сахара для диабетиков, легко усвояемой формы йода для людей с заболеваниями щитовидной железы.

Парфюмерно-косметическая промышленность. Маски и обертывания из водорослей получили популярность в салонах красоты как один из видов SPA-процедур (так называемая талассотерапия – терапия с использованием «морских трав»).

В качестве формообразующих агентов в парфюмерно-косметической промышленности получили широкое применение альгинаты: как компонент зубных паст, кремов, средств для бритья, помад, масок, пенки для укладки волос, мыла, шампуней. Производители косметики могут указывать на упаковках своих товаров, что в их состав входят самые разнообразные экстракты водорослей, натуральный глицерин, β -каротин, минералы из водорослей, оказывающие благотворное действие на кожу или волосы. Но потребителям необходимо помнить, что во всем мире состав, качество и действие косметической продукции контролируется в значительно меньшей степени, чем, например, продуктов питания, функциональных пищевых добавок и, тем более, фармацевтических препаратов, к качеству которых предъявляются самые жесткие требования. Исключение составляет лечебная косметика, которая приравнивается к лекарствам, распространяется через аптеки и стоит намного дороже.

В животноводстве актуальна задача создания кормов, которые бы обеспечивали высокую продуктивность сельскохозяйственных животных. Эксперименты по введению водорослей в кормовой рацион в качестве кормовой добавки проводились практически на всех продуктивных сельскохозяйственных животных (курах, индюках, свиньях, коровах, кроликах, овцах, норках), на насекомых (тутовом шелкопряде и пчелах), и объектах аквакультуры (устрицах, трепангах, мидиях, гребешке, рыбах). Во всех случаях были получены положительные результаты: стимуляция роста, развития,

иммунитета, усвояемости грубых кормов. Увеличивалась продуктивность и качество продукции в соответствии с видом животных: привес, плодовитость, количество яиц и их масса, вывод из яиц, молочность, настриг шерсти, качество шкур, шелконосность, масса и разматываемость коконов, количество грен. Использование водорослей в качестве кормовой добавки в ряде случаев снимало зависимость продуктивности животных от весенне-летнего сезона, когда имеются в наличии свежие корма. Однако для получения экономически значимых эффектов требуется достаточно высокая доза кормовых добавок из водорослей: курам – 20 г сырой массы на голову в сутки, свиньям – 1,5 кг, коровам – 2–3 кг. Затраты на производство такого количества водорослевой биомассы оказались несравнимо высокими по отношению к экономическому эффекту в животноводстве. На современном уровне развития альготехнологии внедрение кормовых добавок на основе водорослей оказалось нерентабельным, поэтому одна из основных проблем в альготехнологии – снижение себестоимости получения водорослевой биомассы.

В химической промышленности водоросли могут служить исходным сырьем в решении задач производства составов с уникальными свойствами. На основе веществ водорослевого происхождения производятся реактивы для лабораторных исследований (агар и хлорелло-пептонный агар для микробиологических сред, агароза – фракция агара с высокими поляризационными свойствами – для электрофореза в геле, изотопно меченные органические вещества для биохимических исследований, токсины для моделирования патологических состояний у лабораторных животных, флуоресцентные маркеры для цитохимии на основе фикобилинов). Наиболее широкое применение приобрели фикоколлоиды: альгинаты используются для производства глянцевателей кожи, тканей и бумаги, для производства клеев, красок, фото- и киноплёнок, целлофаноподобных плёнок, резины, пластмасс, форм для зубов, огнеупорных тканей, водорастворимых нитей; агар входит в состав смазок для вытягивания вольфрамовых проволок для ламп накаливания, глянцевателей кожи, тканей и бумаги, типографских красок, фотоэмульсий, исполь-

зуется в производстве аккумуляторов; на основе каррагинана производятся стоматологические слепки, формы для литья.

Технологии, основанные на жизнедеятельности водорослей. Водоросли являются естественными компонентами водных и почвенных ценозов. В процессе фотосинтеза они формируют органическое вещество, обогащают среду кислородом, смещают рН в щелочную сторону. Азотфиксирующие синезеленые водоросли включают атмосферный азот в биологический круговорот. Водоросли накапливают в клетках макро- и микроэлементы, выделяют в среду экзометаболиты, которые оказывают влияние на другие организмы, в частности, на высшие растения и бактерии. Вследствие способности к миксотрофному питанию водоросли метаболизируют органические вещества, присутствующие в среде. Причем, водоросли являются одним из наиболее эволюционно древних компонентов ценозов, их наиболее устойчивым и пластичным компонентом. Это позволяет решать ряд задач в следующих областях.

Растениеводство. Водоросли могут быть использованы в качестве живых **зеленых удобрений**. Процесс внесения в почву живых водорослей, предварительно выращенных в массовой культуре, называют альгализацией почв. Помимо перечисленных выше положительных эффектов, связанных с жизнедеятельностью водорослей, они также структурируют почву и удерживают в ней влагу, выделяя слизи. Использование живых культур водорослей в растениеводстве, как и в животноводстве, не получило широкого распространения из-за высокой стоимости биомассы. Исключение составляет только культивирование синезеленых водорослей в водах рисовых полей. В регионах, где доступно большое количество дешевой биомассы (например, где наблюдаются штормовые выбросы макроводорослей), из нее готовят **компост** для удобрения сельскохозяйственных земель.

Суспензии микроводоросли *Chlorella vulgaris* испытывали в экспериментах по **предпосевной обработке семян**. Эксперименты проводились на семенах хлопчатника, риса, пшеницы, винограда, ржи, арахиса, арбуза. Были выявлены положительные эффекты, которые заключались в повышении

всхожести, устойчивости, биомассы, урожайности высших растений, и даже в увеличении содержания аминокислот и липидов в семенах нового урожая. Однако широкого распространения эта практика не получила по той же причине дороговизны водорослевой биомассы на современном этапе развития промышленного культивирования водорослей.

В то же время, в биотехнологии высших растений получил развитие метод совместного культивирования синезеленых азотфиксирующих водорослей с культурой клеток, тканей, регенерантов и черенков высших растений, то есть создания *искусственного симбиоза водоросли–высшие растения*. В качестве водорослевого компонента симбиоза испытывались представители родов *Nostoc*, *Anabaena*, *Gloeocapsa*, *Chlorogloeopsis*. Опыты ставились на высших растениях: морковь, табак, люцерна, диоскорея, раувольфия, женьшень, причем у 3 последних видов в присутствии синезеленых водорослей усиливалась выработка фармацевтически ценных веществ. Синезеленые водоросли обогащают среду культивирования азотом и выделяют вещества с фитогормон-подобной активностью, оказывающие влияние на клетки высших растений.

Экотехнологии. Это раздел биотехнологии, построенная по типу природных процессов совокупность технологических приемов, с помощью которых можно улучшить или стабилизировать качество природной среды. Водоросли устойчивы к компонентам бытовых и промышленных стоков. Они способны к аккумуляции тяжелых металлов (ТМ) и радионуклидов (РН) (которые в малых дозах представляют собой микроэлементы или подобны им по строению). Водоросли достаточно быстро приобретают способность метаболизировать органические вещества синтетического происхождения, например, пестициды, продукты неполного сгорания органического топлива. При помощи культур водорослей можно также связывать углекислый газ, образующийся в результате сгорания топлива, что способствует борьбе с «парниковым эффектом». В связи с этим водоросли могут использоваться для *очистки* от ТМ, РН и органического загрязнения любых сред: воды, атмосферы, почвы. Определенную технологическую сложность представляет задача очистки почв от ТМ и РН: необходимо

привести в контакт частицы загрязненной почвы с биомассой водорослей, а затем отделить биомассу, аккумулировавшую загрязнения, от очищенной почвы.

Примечательно, что только водоросли, в отличие от других организмов, способствуют очистке сред и от микробного загрязнения (*E. coli*).

Благодаря способности аккумулировать ионы и коллоидные частицы металлов (золото, серебро, кобальт, никель, молибден), водоросли используются *в обогащении руд*. В биомассе водорослей накапливается свыше 1% ценных металлов, что делает их выделение рентабельным.

Естественно, биомасса водорослей, которая нарастает в ходе реализации экотехнологий, не может использоваться для получения биологически активных веществ. В этом случае органическое сырье из водорослей может перерабатываться в *топливо* – биогаз, биодизель, биоэтанол. Некоторые виды водорослей способны синтезировать нефтеподобные углеводороды (*Botryococcus braunii*) и выделять водород. Их целенаправленное культивирование – одно из популярных сегодня направлений исследований в области альтернативной энергетики.

Процессы жизнедеятельности водорослей используются в разработке *замкнутых систем жизнеобеспечения* – искусственных биосистем, которые должны будут поддерживать жизнедеятельность человека в случае его изоляции от биосферы. Это космические станции и межпланетные корабли, подводные лодки, изолированные поселения, в перспективе – города будущего. Уже сегодня внедрение замкнутых систем жизнеобеспечения крайне необходимо на рыбоводческих фермах, в марикультуре моллюсков, поскольку эти предприятия существенно загрязняют окружающую среду. К настоящему моменту с использованием водорослей в замкнутых системах жизнеобеспечения хорошо разработана регенерация атмосферы и воды, регенерация пищи разработана хуже. Водоросли проявили себя как наиболее стабильное, неаварийное звено таких систем.

Технологии, основанные на физиологических реакциях водорослей. Физиологические реакции водорослей (интенсивность роста культуры, интенсивность флуоресценции кле-

ток) используются в качестве тест-функций при определении токсичности сточных и природных вод, донных отложений, отработанных буровых растворов и различных загрязняющих веществ, а также, в некоторых зарубежных странах, для определения витаминов в биологических жидкостях (моче и крови). Метод определения веществ и их воздействия на живые организмы с помощью биологических тест-объектов получил название **биотестирования**. Биотестирование обычно применяется наряду с физико-химическими аналитическими методами и имеет по сравнению с ними преимущества: биотесты чувствительны к концентрациям тестируемых веществ в 10–100 раз меньшим, чем позволяют выявить физико-химические методы; при оценке токсичности они дают возможность получить интегральную оценку действия отдельных токсикантов и их смесей на живые организмы.

Методы биотестирования регламентируются государственными стандартами и используются при установлении нормативных требований к качеству вод, проведении экологического контроля за соблюдением нормативов допустимых сбросов химических веществ и воздействий хозяйственной деятельности на водные объекты; осуществлении экологического мониторинга водных объектов; оценки состояния водных экосистем. Согласно государственным стандартам Украины для биотестирования пресных вод должны использоваться *Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*, для биотестирования морских вод – *Phaeodactylum tricornutum* и *Skeletonema costatum*. Кроме того, биотестирование проводится на бактериях, ракообразных, рыбах.

Определение витаминов в биологических жидкостях проводят с помощью культур ауксотрофных по данным витаминам видов водорослей. Обнаружение малых доз витаминов в крови и моче позволяет установить неспособность организма усваивать эти витамины.

2.2.2. Основные требования к культиваторам для промышленного выращивания водорослей

Систему оборудования, предназначенную для массового выращивания водорослей в промышленном производстве, на-

зывают культиватором. Различают **фотобиореакторы** для выращивания водорослей на свету и **ферментеры** для гетеротрофного культивирования на органических субстратах (используются для выращивания некоторых видов водорослей). Культиватор состоит из ряда подсистем, при проектировании которых должен выполняться ряд требований.

1. **Система реакторов.** Реактором (биореактором) называют емкость, в которой находится и растет культура.

По **степени изоляции реактора от окружающей среды** различают открытую, закрытую и герметичную культуру. **Открытые реакторы** располагают под открытым небом. Это могут быть бассейны солепромыслов и рыбозаводных хозяйств, участки литорали, либо специально организованные бассейны или каналы с герметичным дном, деревянные корыта, выстланные полиэтиленом, и любые другие открытые емкости. Преимуществом открытых систем является их простота и дешевизна, недостатком – зависимость от погодных условий, суточной и сезонной периодичности, подверженность культуры загрязнению, в том числе – попаданию посторонних организмов. Во время дождя небольшие емкости с культурой можно закрывать щитами или пленкой, или откачивать культуру в сообщающийся с основным закрытый резервуар, использовать искусственную подсветку. Открытая культура представляет собой пример минимальной степени контроля за условиями выращивания водорослей со стороны человека и по своей сути представляет переход от промысла к культивированию. Макроводоросли в настоящее время выращиваются только открытым способом. Большинство производств, культивирующих микроводоросли в коммерческом масштабе, также основаны на открытой культуре.

Закрытые реакторы располагают в помещении, чаще всего в теплице. Капитальные вложения в данном случае выше, чем при открытом культивировании, но и меньше зависимость от неблагоприятных погодных условий.

Несомненным достоинством **герметичных реакторов** является их полная изолированность от окружающей среды и возможных загрязнений, что позволяет выращивать в промышленных масштабах даже бактериологически чистую культуру.

Герметичные реакторы можно располагать как под открытым небом, так и в помещении. Недостатками герметичных реакторов являются весьма существенные капитальные вложения и необходимость организации принудительного газообмена.

Материал реакторов должен быть химически инертным, не вступать в реакцию с водой, компонентами питательных сред, экзометаболитами водорослей. Материал не должен быть токсичным для клеток водорослей. Допустимыми материалами являются глей, дерево, бетон, нержавеющая сталь пищевых марок (X18H10T), сплавы титана, стекло, кварц, оргстекло, белая вакуумная резина, пищевой полиэтилен, фторопласт, другие пластики, совместимые с питьевой водой и пищей. Абсолютно недопустимыми материалами являются различные сплавы, содержащие медь и свинец (сильнейшие альгициды!), черная и красная резина, сплавы алюминия, чугуна, пластики, содержащие токсичные для клеток водорослей наполнители. Для того чтобы в огромном разнообразии новых синтетических материалов, производимых промышленностью, определить подходящие для изготовления реакторов, необходимо провести эксперимент в лаборатории: сравнить динамику роста культуры и физиологическое состояние клеток в контроле и в присутствии тестируемого материала.

Форма реакторов должна быть такой, чтобы при перемешивании культуры в реакторе не было гидродинамических теней. Выделяют два основных типа формы реакторов – плоскопараллельные (в основе параллелепипед) и трубчато-цилиндрические (в основе – цилиндр). Все углы на внутренней поверхности реактора должны быть скругленными. В противном случае в углах, в области гидродинамических теней будет осаждаться и скапливаться биомасса. Это приведет к неоднородности культуры, снижению качества продукции, нарушению газообмена скопившихся в углах клеток, их отмиранию и отравлению культуры продуктами распада.

Количество реакторов должно обеспечивать постоянную загрузку системы сбора урожая, то есть культура в реакторах должна находиться на разных стадиях роста с тем, чтобы постоянно имелась культура, готовая к сбору урожая (так называемый модульный принцип).

2. Система освещения. Является одной из основных систем, определяющих рентабельность культивирования водорослей. В настоящее время все производства в мире, выпускающие товарную продукцию из водорослей, основаны на естественном освещении. Большие надежды связывают с использованием светодиодов – источников света с узкими диапазонами спектра излучения. Специфические наборы различных светодиодов, создающие излучение со спектром, точно соответствующим спектру поглощения набора фотосинтетических пигментов культивируемых водорослей, позволили бы максимально экономно расходовать электрическую энергию для решения задач промышленного культивирования водорослей.

Основное требование к системе освещения – минимизация потерь света. Следует помнить, что потери света минимальны, если лучи падают на поверхность культуры под прямым углом. Толщина слоя культуры не должна превышать 30 см.

В зависимости от *источника света* освещение культиваторов может быть естественным (солнечный свет), искусственным и комбинированным. При естественном освещении эффективность поглощения энергии будет зависеть от сезона, погоды и времени суток. Проблема зависимости освещения от времени суток решена в герметичных реакторах с волнистой поверхностью. Для минимизации потерь света можно использовать зеркала, направляющие свет на реактор, но нужно помнить, что, отражаясь от зеркала, свет теряет минимум 50 % своей энергии. Потери света минимальны при использовании погруженных в реактор искусственных источников света, например, ламп дневного света, помещенных в стеклянные трубки. Но при этом возникает другие проблемы: избыточный нагрев культуры, адгезия клеток водорослей к нагретым и хорошо освещенным поверхностям трубок, что приводит к затенению остальной культуры. Поэтому погруженные источники света в фотобиореакторах необходимо сочетать с интенсивным перемешиванием.

3. Система термостатирования. Из-за разогрева культуры источниками освещения может понадобиться охлаждение (хладогент – чаще всего холодная водопроводная вода), при культивировании в умеренной зоне – подогрев (исполь-

зуют котельные или воду естественных термальных источников). Предусматривают дополнительную оболочку – рубашку – вокруг ламп, вокруг всего реактора, погружают в суспензию трубки, по которым движется вода или горячий воздух (при использовании котельных). Система термостатирования может быть вынесена за пределы самого реактора, если культивирование организовано по принципу циркуляции (сообщающаяся с реактором емкость окружена рубашкой).

4. Система газообмена. Чем интенсивнее растет культура, тем выше ее потребность в углекислом газе для фотосинтеза и в удалении кислорода. Избыток кислорода, образующегося в процессе фотосинтеза, ведет к фотоокислительным повреждениям клеток и стимулирует фотодыхание, что снижает продуктивность культуры. Источником углекислого газа могут быть: атмосферный воздух, продукты дыхания человека и животных, сжатая углекислота, смесь воздуха с CO_2 , продукты сгорания газа. Нагнетание газа в среду может осуществляться компрессором – так называемый барботаж. Система газообмена может быть вынесена за пределы реактора (при циркуляции), совмещена с теплообменником. Принцип, лежащий в основе вынесенной за пределы реактора системы – гидроциклон. Гидроциклон представляет собой цилиндр, к которому по касательной к его поверхности (тангенциально) в верхней части припаяна трубка. По ней с высокой скоростью поступает насыщенная кислородом суспензия водорослей. Она образует воронку, подобно центрифуге. При центрифугировании газы, растворенные в жидкости, вытесняются. Вверху гидроциклона имеется отверстие для выхода газа. Снизу к цилиндру припаяна трубка, по которой подается воздух или углекислый газ, и трубка, по которой суспензия водорослей, насыщенная углекислым газом, направляется к реактору.

5. Система перемешивания. Перемешивание необходимо для создания равномерных условий внутри реактора, для предотвращения адгезии клеток к поверхностям (обрастания). Основное требование к системе перемешивания – отсутствие гидродинамических теней, т. е. мест в реакторе, где культура неподвижна. В то же время перемешивание должно происходить не слишком интенсивно, чтобы не вызвать разрушения

клеток. Индикатором чрезмерной интенсивности перемешивания является образование пены, которое свидетельствует о выходе белка в среду из поврежденных клеток.

Перемешивание может быть совмещено с газообменом – это **барботажное** перемешивание. Используя простое устройство, называемое эрлифт, можно осуществлять как вертикальное, так и горизонтальное перемешивание культуры. Эрлифт представляет собой открытую трубку, вертикально погруженную в культуру. В нижний конец трубки эрлифта вводится трубка меньшего диаметра, по которой подается сжатый воздух. Благодаря тому, что в трубке образуется эмульсия (смесь жидкости и пузырьков), которая обладает меньшей плотностью, чем окружающая жидкость, жидкость вовлекается в трубку эрлифта и поднимается вверх по градиенту плотности. Верхний конец трубки эрлифта может быть загнут таким образом, чтобы создавать в культуре направленный поток жидкости.

Механическое перемешивание осуществляется с помощью лопастных колес. Наиболее эффективная система с механическим перемешиванием представляет собой (в самом простом случае) прямоугольный бассейн со скругленными углами, перегородкой посередине и 1–2 лопастными колесами. В результате вращения лопастных колес культура движется вокруг перегородки, как по беговой дорожке стадиона. Эта система получила соответствующее название – рейсвей (от англ. «raceway» – беговая дорожка). Культура в рейсвее вместо лопастных колес может приводиться в движение загнутыми сверху трубками-эрлифтами (от англ. «air» – воздух и «lift» – поднимать). В эрлифте культура приводится в движение вверх и вдоль рейсвея пузырьками воздуха за счет разности удельных масс жидкости и эмульсии воздуха в жидкости. Механическое перемешивание может происходить за счет движения частей реактора друг относительно друга. Так, в космосе использовали культиватор, в котором тонкий слой суспензии водорослей находился между двумя вращающимися цилиндрами.

Циркуляционное перемешивание предусматривает создание замкнутого контура, по которому культура прокачивается с помощью насоса. Такие системы подходят для выращивания водорослей с прочными клеточными стенками, устойчивых к

многократному прокачиванию насосом. Циркуляция может осуществляться отчасти за счет силы тяжести. Насос поднимает культуру на определенную высоту, а затем по гладкой поверхности или каскаду (ступенек или тарелок) культура стекает. Циркуляция может быть организована по аналогии с фонтаном, накрытым стеклянным куполом, по внутренней поверхности которого стекает культура. Может быть совмещенное *циркуляционное и механическое* или *барботажное и механическое* перемешивание. Насос откачивает культуру из круглого бассейна, возвращается культура через полую трубчатую мешалку в виде буквы Т, установленную в центре бассейна. В трубке имеются отверстия, на ее разных плечах они направлены в противоположные стороны. Циркуляция культуры ведет к вращению трубки и дополнительному механическому перемешиванию. Совмещение барботажного и механического перемешивания происходит, если по трубке подавать не культуру, а воздух.

6. Система сбора урожая. Затраты на сбор урожая и эффективность этого процесса вместе с системой освещения оказывают наибольшее влияние на себестоимость продукции из водорослей и на рентабельность процесса производства. Именно системе сбора урожая посвящено большинство изобретательских решений в области конструкции культиваторов.

В самом простом случае сбор урожая в нециркуляционных системах осуществляется отъемно-доливным способом, т. е. часть культуры изымается, при этом в реактор доливается свежая питательная среда. В автоматизированных системах для этих целей предусмотрен узел дозирования. В циркуляционных системах узел сбора урожая может быть установлен прямо в контуре циркуляции, среда может использоваться вторично.

Концентрирование биомассы микроводорослей при сборе урожая может осуществляться методом отстаивания в высоких емкостях. При этом биомасса собирается в виде жидкого концентрата или пасты с высоким содержанием воды, а надосадочная жидкость может использоваться для посева культуры, так как обычно содержит наиболее активно делящиеся клетки. Лучшему отделению биомассы от воды способствует фильтрация, но фильтровальные элементы довольно быстро

забиваются биомассой и требуют замены. Разрабатываются различные конструкции самоочищающихся фильтров. На большинстве производств на современном этапе используются проточные центрифуги, так как они лидируют среди всех методов по эффективности отделения биомассы водорослей от питательной среды. Вместе с тем, центрифуги представляют собой дорогое, энергоемкое, подверженное износу и опасное в эксплуатации оборудование.

Для сбора урожая также используют различные методы, подобные тем, что используются в очистке питьевой воды: сорбцию биомассы на различных сорбентах (например, стекле, полипропиленовых гранулах, специфических минералах), флокуляцию (соосаждение) с различными агентами (специфическими полимерами, гидроксидами железа и алюминия), флотацию (всплывание) с различными флотагентами (чаще всего – с пузырьками воздуха – воздушную флотацию). Наибольшую перспективу имеет разработка методов отделения водорослевой биомассы от среды с использованием гидроциклонов, так как они сочетают простоту конструкции с наиболее эффективным принципом работы – принципом проточной центрифуги.

Водорослевая биомасса может перерабатываться и использоваться в форме суспензии (гидромасса), пасты (после отстаивания, центрифугирования, фильтрования) и сухой массы. Высушивание может осуществляться при естественной температуре на стекле или полиэтилене, но не в прямых солнечных лучах, в потоках горячего воздуха. Лучше всего сохраняется лиофилизированная биомасса, то есть замороженная и высушенная под вакуумом в сублимационных сушках.

2.2.3. Современные методы переработки биомассы

Продукты, которые возможно получать из водорослей являются инновационными и зачастую представляют натуральную альтернативу продуктам химического синтеза. Извлечение этих продуктов из биомассы водорослей вполне может вестись и с помощью традиционных технологий химико-фармацевтических производств (см., например, [4]) с использова-

нием синтетических и нефтехимических растворителей и реагентов, большинство из которых токсичны и взрывоопасны. Но такой подход нивелирует достоинства продуктов из водорослей как натуральных.

Кроме того, в производстве существует потребность в инновационных технологиях экстракции биологически активных веществ. Требованием к таким технологиям должна стать безвредность для окружающей среды, персонала и потребителей продукции. С данной точки зрения, бесспорную перспективу имеет технология сверхкритической флюидной экстракции диоксидом углерода.

Сверхкритическим флюидом называют состояние вещества при давлении и температуре выше критических. При сверхкритических давлениях и температурах отсутствует граница между жидкой и газообразной фазой, и вещество приобретает свойства, промежуточные между свойствами газа и жидкости. Для диоксида углерода критическими являются давление 73,8 бар и температура 304,1 К. Вязкость и диффузионная способность флюидов приближаются к таковым газов, а плотность и растворяющая способность – к таковым жидкостей. Это делает сверхкритические флюиды практически идеальными экстрагентами.

Сверхкритический CO_2 является неполярным растворителем. Спектр неполярных соединений, растворимых в сверхкритическом CO_2 , шире, чем для любого из известных органических растворителей. Он может быть расширен в полярную область добавлением небольших количеств полярных сорастворителей (модификаторов, энтрейнеров), из которых предпочтительным является этанол, в силу его натурального происхождения. Тотальные экстракты растительного сырья, полученные с помощью сверхкритического CO_2 , по качественному и количественному составу природных соединений богаче экстрактов, полученных с помощью традиционных технологий, и не содержат посторонних примесей.

Нерастворимыми для сверхкритических флюидов являются только высокомолекулярные соединения: белки, олиго- и полисахариды, нуклеиновые кислоты, другие природные полимеры. Тем не менее, и они могут быть получены путем от-

мывки от низкомолекулярных веществ сверхкритическими растворителями. В сверхкритических средах сохраняется активность многих ферментов. Комбинируя сверхкритическую экстракцию с технологией иммобилизованных ферментов либо с предобработкой сырья гидролитическими ферментами, можно выделить природные полимеры в индивидуальном виде.

Уникальным свойством сверхкритических флюидов является также то, что, изменяя давление и температуру в пределах сверхкритической области, можно изменять растворимость в них отдельных соединений. Это позволяет избирательно извлекать из сырья, а также избирательно осаждать из экстрактов отдельные компоненты. В сверхкритических средах реализованы такие способы тонкой очистки веществ, как сверхкритическая дистилляция в колоннах и сверхкритическая препаративная хроматография. Таким образом, с помощью сверхкритических флюидных технологий можно извлечь из растительного сырья и выделить в чистом виде практически любое соединение.

Диоксид углерода дешев, инертен, взрывобезопасен, не горюч. Сверхкритические процессы экстракции и разделения веществ осуществляются при температурных режимах, не вызывающих термического разложения природных соединений, в отсутствие света и окисляющего действия кислорода. Сверхкритические среды обладают стерилизующим эффектом и препятствуют микробной контаминации продуктов. Сверхкритические технологии характеризуются низкими эксплуатационными затратами. Растворители циркулируют в замкнутом цикле и используются вторично. Сточные воды и токсичные выбросы в атмосферу отсутствуют. Оборудование для сверхкритических технологий герметично, автоматизировано и соответствует международным стандартам.

2.2.4. Способы повышения продуктивности культур

Помимо изобретательских и инженерных решений в области конструкции культиваторов, в особенности, системы сбора урожая и системы освещения, которые на современном этапе лимитируют развитие промышленного культивирова-

ния водорослей, рентабельность водорослевых производств может быть повышена путем выбора наиболее продуктивной культуры и оптимизации условий культивирования.

Самым простым способом подбора наиболее продуктивного объекта культивирования является *скрининг* штаммов и изолятов – сравнительное изучение продуктивности как можно большего числа штаммов, хранящихся в коллекциях, а также изолятов, выделенных из различных местообитаний.

Как и любой другой биологический объект, водоросли могут быть объектом классической *селекции*. Как и в случае других объектов, генетическое разнообразие материала для селекции может быть повышено путем мутагенеза: химического (с использованием нитрозаминов, алкиллирующих агентов и других химических мутагенов) и/или физического (с использованием ультрафиолета, рентгеновских лучей).

В активно растущей культуре, особенно в интенсивной непрерывной культуре, поддерживаемой в состоянии экспоненциального роста, со временем начинают преобладать те клетки, которые способны к наиболее интенсивному размножению. То есть сам собой происходит отбор генотипов, наиболее продуктивных по биомассе. Это явление часто называют «автоматической селекцией» или «автоселекцией».

Что касается продуктивности культур по тем или иным целевым метаболитам, в этом случае автоселекция возможна, только если данный метаболит дает организму преимущество при действии селективного фактора (например, ультрафиолетовое облучение позволяет отобрать генотипы водорослей с высокой интенсивностью синтеза каротиноидов). В большинстве случаев процедура селекции водорослей состоит в получении клоновых культур, их субкультивировании и сравнении их продуктивности.

Водоросли также могут быть объектом *клеточной и генной инженерии*. В этой области в мире уже достигнуты определенные успехи. Например, получены межвидовые соматические гибриды диатомовых водорослей, конъюгат (систематических групп, для которых конъюгация – слияние протопластов – является типичным способом полового воспроизведения), некоторых макроводорослей. В геном видов

рода *Chlamydomonas* внедрены гены, способствующие более интенсивной выработке водорода – перспективного «зеленого» топлива. Некоторые представители синезеленых водорослей (*Anabaena*, *Nostoc*) трансформированы генами бактерии *Arthrobacter*, обуславливающими устойчивость к определенным пестицидам и способность их метаболизировать. Синезеленые водоросли рода *Synechococcus* трансформированы геном зеленой водоросли *Haematococcus pluvialis*, кодирующим фермент, который катализирует окисление β -каротина в астаксантин. В перспективе это позволит получать ценный антиоксидант астаксантин из легко культивируемого *Synechococcus*, а не из более «капризного» *Haematococcus*. Ведутся работы по получению вакцин из генетически модифицированных бурых водорослей.

Помимо выбора или создания наиболее продуктивного объекта культивирования, эффективность производства повышают также путем *оптимизации условий культивирования* этого объекта. Целям оптимизации служат многофакторные эксперименты, построенные по особому плану. В таких экспериментах необходимо исследовать влияние на урожай всех факторов, действующих на культуру. На первом этапе проводят так называемый отсеивающий эксперимент, чтобы выбрать факторы, оптимизировать которые наиболее экономически целесообразно. Задача второго этапа – получить математическую модель (уравнение регрессии), описывающую зависимость урожая от выбранных факторов. На третьем этапе, основываясь на коэффициентах модели, ставят несколько уточняющих опытов для поиска оптимального сочетания факторов. Планы экспериментов по оптимизации приводятся в специальной литературе (см. например [5, 6]).

2.2.5. Проблемы и перспективы экспериментальной альгологии

Несмотря на всю привлекательность водорослей как объекта, не более 1 % известной мировой флоры водорослей можно считать хоть в малейшей степени изученными физиолого-биохимически. С одной стороны, это открывает широчайшее

поле для исследований, с другой – связано это с тем, что для биолога-экспериментатора работа с водорослями сопряжена с рядом трудностей. Он должен не только владеть соответствующими методами исследования, но и хорошо знать биологию своих объектов, а также, особенно принимая во внимание разнообразие водорослей, обладать знаниями по их систематике.

Любые методы физиолого-биохимических исследований имеют предел разрешения. Это значит, что для проведения экспериментов необходимо нарастить в культуре достаточное количество материала. Для большинства методик минимальное количество материала составляет несколько миллионов клеток или десятки миллиграмм сухой массы. Естественно, материал должен быть моновидовым, поэтому данный вид должен быть предварительно выделен в чистую культуру. Далеко не все виды водорослей легко выделяются в чистую культуру. Сложность, в частности, представляют виды, которые в природных условиях встречаются редко и единично. Но и не все массовые виды успешно культивируются. Как считают, остаются не выясненными компоненты среды или условия, необходимые для их выращивания.

Для некоторых исследовательских задач требуется, чтобы культура была не только моновидовой (альгологически чистой), но и свободной от бактерий (бактериологически чистой, аксеничной). Это задачи, связанные с определением экзометаболитов водорослей (веществ, прижизненно выделяемых клетками водорослей в окружающую среду), с внесением в культуральную среду радиоактивно меченных предшественников и любые другие эксперименты, на результат которых может повлиять бактериальный компонент культуры. Получение бактериологически чистой культуры довольно трудоемко и часто сопряжено с использованием факторов (антибиотики, ультрафиолет), которые могут вызвать у выделяемых в культуру водорослей мутации, то есть привести к генетическому изменению материала по сравнению с природным. Кроме того, некоторые водоросли плохо растут в аксеничной культуре. За миллиарды лет совместного обитания между водорослями и сопутствующими им бактериями сложились тесные метаболические и регуляторные связи. Из-

вестно, что каждому виду водорослей в культуре сопутствует свой специфичный, достаточно небольшой (до десятка) комплекс видов бактерий. Например, макроводоросль *Ulva* в отсутствие бактериального компонента культуры не развивает нормальные талломы и растет в виде каллуса.

Достаточно большую проблему представляет собой интерпретация и экстраполяция данных, полученных в лабораторных экспериментах на водорослях. Данные, полученные на материале, представляющем собой несколько миллионов разных индивидуумов, дают их усредненную характеристику. Культура микроводорослей гетерогенна по целому ряду признаков. В ней находятся индивидуумы, которые различаются: по генотипу, по фазе клеточного цикла, фазе жизненного цикла, по физиологическому состоянию. Их реакция на экспериментальные воздействия может быть различной, даже диаметрально противоположной. В процессе культивирования соотношение различающихся индивидуумов изменяется, что может приводить к большому разбросу экспериментальных данных. Существует ряд подходов для снижения гетерогенности культур.

Для снижения генетической гетерогенности используют клонные культуры, представляющие собой потомство одной клетки. Это наиболее эффективно для видов, в жизненном цикле которых отсутствует половой процесс.

Для снижения гетерогенности культуры по фазам клеточного цикла используют синхронизацию культур. Для этого культуру подвергают действию фактора, который останавливает клеточные деления (темнота, субоптимальная температура, дефицит биогенов), затем, через определенный промежуток времени, снимают действие этого фактора, что приводит к одновременному вступлению большинства клеток в культуру в митоз. Синхронизовать культуры удастся не более чем на 2–3 клеточных деления, после чего снова происходит десинхронизация. И даже в синхронной культуре всего 60–70 % клеток делится одновременно.

Оптимальным, но и довольно дорогим, подходом к решению проблемы гетерогенности культур микроводорослей является использование цитофлуориметра – прибора, который позволяет определять морфологические и биохимические показатели индивидуальных клеток.

Обычно ограничиваются стандартизацией условий культивирования и пересева культур водорослей. Известно, что исходная концентрация клеток при посеве и стадия роста культуры, из которой взят инокулят для посева, влияют на динамику роста культуры. Поэтому при проведении экспериментов с водорослями рекомендуется не только контролировать условия культивирования, но и исходную концентрацию клеток, а также популяционный возраст культуры, из которой взят инокулят, и популяционный возраст культуры, в котором проводятся эксперименты. Естественно, популяционный возраст культуры не имеет ничего общего с возрастом индивидуума. Это время, в течение которого культура растет с момента пересева. Считают, что в популяции клеток, которую представляет собой культура, действуют внутренние регуляторные механизмы, которые управляют соотношением индивидуумов, находящихся в разных фазах клеточного и жизненного циклов. Изучение гетерогенности культур и управляющих ею механизмов – отдельное направление экспериментального исследования микроводорослей.

Даже при соблюдении одинаковых условий посева культур и культивирования водорослей данные, полученные разными авторами в разных лабораториях, могут не совпадать и даже противоречить друг другу. Часто такие противоречия объясняют генетическими различиями между культурами, на которых проводились исследования. Исследователь может самостоятельно выделить моновидовую культуру водоросли из природного местообитания. Такую культуру, если она выделена недавно и еще не охарактеризована, правильно называть изолятом. Если культура выделена и поддерживается достаточно давно, зарегистрирована под определенным номером в специализированной коллекции (банке культур), на ней проведен ряд исследований, позволяющих дать ее физиолого-биохимическую характеристику, ее называют штаммом. Исследователи, использующие водоросли в качестве модельных объектов для изучения фундаментальных проблем биологии, предпочитают работать со штаммами. Это позволяет сделать данные, полученные в разных лабораториях, более сопоставимыми. Но, учитывая короткое время генерации микрово-

дорослей, следует ожидать, что даже культуры одного штамма, длительное время поддерживаемые в разных лабораториях, могут существенно отличаться.

Тем более, различаются характеристики лабораторных изолятов и штаммов и природных популяций водорослей. Поэтому данные, полученные на одном штамме или одном изоляте, не следует механически экстраполировать на природные популяции микроводорослей. Связано это еще и с тем, что питательные среды для культивирования водорослей содержат концентрации биогенов, в сотни раз превышающие таковые в природных водах. Для природных водоемов такая степень эвтрофирования была бы катастрофической. Это не может не сказываться на самих результатах экспериментов, а также на особенностях лабораторных культур, так как в них пассаж за пассажем идет отбор под действием этого селективного фактора. Если задача исследования – выяснить с помощью лабораторных экспериментов, что происходит в природных водоемах, предпочтительно вести так называемую природную культуру, условия в которой максимально приближены к природным, и использовать не лабораторные штаммы, а выделенные из природных местообитаний изоляты.

Данные, полученные на одном изоляте или штамме, не следует также экстраполировать на вид в целом, а тем более на отдел. Данные, полученные на одном виде, даже на нескольких штаммах, также не следует экстраполировать на таксоны более высокого ранга без дополнительных исследований других видов. Не следует также использовать отдельные биохимические или ультраструктурные признаки, особенно выявленные только у единичных лабораторных штаммов в культуре, для построения систем водорослей без учета всего комплекса признаков классифицируемых объектов. При филогенетических построениях на основе данных биохимии следует также помнить о метаболической пластичности водорослей и зависимости их состава от условий культивирования.

Итак, водоросли представляют собой удобный для экспериментальных исследований и еще мало изученный объект. Экспериментальная работа с водорослями, как и с любым другим объектом, требует корректной постановки экспериментов и интерпретации полученных данных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обзор внешнего и внутреннего строения, биологии и экологии представителей из разных групп водорослей подтверждает чрезвычайное разнообразие всех признаков у этих древних первичноводных фотосинтезирующих форм. У водорослей четко прослеживается усложнение всех признаков в ходе эволюции. Эти уникальные организмы являются убедительной иллюстрацией многих положений теории эволюции, разработанных и хорошо изученных на примере высокоорганизованных форм растений и животных: гетеробатмии (мозаичной эволюции), конвергенции, дивергенции, параллелизма, симметрии, полярности и др. Сравнительный анализ данных, полученных при изучении водорослей современными методами, подтверждает верность основных положений теории эволюции и на ультраструктурном уровне.

Природные популяции представляют практически неисчерпаемый материал для исследования всех аспектов жизнедеятельности водорослей. Выделение водорослей в культуру и изучение их в условиях лаборатории при понимании исследователем всех перспектив и ограничений культурального метода и лабораторного эксперимента способно дать ответ на многие актуальные вопросы физиологии, биохимии и генетики водорослей, а также открыть новые перспективы практического использования этих, во многих отношениях уникальных, организмов.

Следует отметить, что морфологические и цитологические признаки водорослей, а также характерный состав фотосинтетических пигментов и химическая природа продуктов ассимиляции, которые лежат в основе традиционных клас-

сификационных схем, изучены достаточно хорошо для подавляющего большинства известных видов водорослей, как в природных популяциях, так и в лабораторной культуре. По сравнению с этим массивом данных достаточно ограниченное число видов охарактеризовано физиолого-биохимически, по отдельным ультраструктурным признакам и молекулярно-генетическим маркерам, причем в подавляющем большинстве случаев только в культуре. Так, фактический материал современной молекулярной филогенетики – расшифрованные последовательности всего нескольких участков генома у относительно небольшого числа видов. Для очень малого числа видов водорослей проведено секвенирование всего генома, при этом остаются не ясными механизмы функционирования и эволюции генома как целого.

Изучая водоросли, необходимо учитывать их высокую пластичность и чрезвычайное разнообразие адаптивных реакций на меняющиеся условия обитания. При работе с лабораторными штаммами следует помнить о вероятных отклонениях, возникающих в силу разных причин в условиях культуры. Поэтому предлагаемые на сегодняшний день филогенетические схемы, построенные на основании отдельных признаков ультраструктуры, (форма крист в митохондриях, тип волосков на поверхности клеток или жгутиков, число микротрубочек в ризопласте зооспор, детали митотического цикла – место центриолей относительно веретена, сохранение телофазного веретена и т. п.), а также с использованием методов молекулярной кладистики, корректно было бы рассматривать в качестве гипотез, а выделение новых таксонов по ультраструктурным и молекулярным признакам у морфологически сходных форм с идентичным набором пигментов и продуктов ассимиляции следует считать скорее провизорным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Водоросли. Справочник/ Вассер С.П., Кондратьева Н.В., Масюк Н.П. и др. – Киев: Наук. думка, 1989. – 608 с.
2. Визначник прісноводних водоростей Української РСР. – Київ: Наук. думка, 1938-1993. – Вип. I-XII.
3. Гусев Е.Е. Гипергалинная аквакультура. – М.: Агропромиздат, 1990. – 159 с.
4. Дытнерский Ю.И. Процессы и аппараты химической технологии: Учебник для вузов. В 2 кн. – М.: Химия, 1995.
5. Максимов В.Н. Многофакторный эксперимент в биологии. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1980. – 280 с.
6. Максимов В.Н., Федоров В.Д. Применение методов математического планирования эксперимента при отыскании оптимальных условий культивирования микроорганизмов. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1969. – 128 с.
7. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. – Киев: Наук. думка, 1975. – 247 с.
8. Музафаров А.М., Таубаев Т.Т. Культивирование и применение микроводорослей. – Ташкент: Фан, 1984. – 136 с.
9. Определитель пресноводных водорослей СССР. – М.-Л.: Наука, 1951-1986. – Вып. 1-14.
10. Седова Т.В. Основы цитологии водорослей. – Л.: Наука, 1977. – 165 с.
11. Седова Т.В. Кариология водорослей. – СПб.: Наука, 1996. – 184 с.
12. Силкин В.А., Золотухина Е.Ю., Бурдин К.С. Биотехнология морских макроводорослей. – М.: Изд-во МГУ, 1992. – 152 с.

13. Судьина Е.Г., Лозовая Г.И. Основы эволюционной биохимии растений. – Киев: Наук. думка, 1982. – 358 с.
14. Штоль А.А., Мельников Е.С., Ковров Б.Г. Расчет и конструирование культиваторов для одноклеточных водорослей. – Красноярск: Красноярское книжное изд-во, 1976. – 96 с.
15. Algal culturing techniques / Ed. R.A. Andersen. – Elsevier Academic Press, 2005. – 578 p.
16. Algal Physiology and Biochemistry / ed. Stewart W.D.P. – Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1974. – 989 p.
17. Süßwasserflora von Mitteleuropa. – Jena: Gustav Fisher Verlag, 1978-2001. – Bd. 1-19(1); Heidelberg: Elsevier/Spektrum, 2005. – Bd. 19(2).